

**Genexpression verschiedener an der Signaltransduktion der TNF-  
Rezeptoren beteiligter Komponenten bei Patienten mit  
verschiedenen Verlaufsformen der multiplen Sklerose**

Etablierung einer quantitativen RT-PCR zur Analyse der Genexpression von TRADD und  
FADD in humanen Leukozyten

**Inauguraldissertation**

Zu Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von:

**Martha Ewa Rühlmann, geb. Mistarz**  
aus Kedzierzyn-Kozle

Gießen 2011

Aus der Klinik für Neurologie  
(Direktor Prof. Dr. med. Manfred Kaps)  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Patrick Oschmann

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 27.10.2011

Für meine Mutter  
in Dankbarkeit

## **Erklärung zur Verfassung der Dissertation**

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Martha Rühlmann, geb. Mistarz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Multiple Sklerose.....	1
1.1.1 Historische Entwicklung.....	1
1.1.2 Definition und Bedeutung.....	2
1.1.3 Das klinische Bild der MS.....	4
1.1.3.1 Die klinischen Symptome.....	4
1.1.3.2 Die unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung.....	4
1.1.3.3 Expanded Disability Status Scale (EDSS).....	7
1.1.4 Aktuelles Verständnis der Pathogenese.....	7
1.1.4.1 Die Remyelinisierungsprozesse.....	8
1.1.4.2 Aktive und chronische Läsionen.....	8
1.1.5 Aktueller immunologischer Forschungsstand.....	9
1.2 Die TNF-Rezeptoren, TRADD und FADD.....	12
1.2.1 Bedeutung der TNF-Rezeptoren in der Pathoimmunogenese der MS.....	12
1.2.2 Aufbau der TNF-Rezeptor Familie.....	13
1.2.3 Die TNF-Rezeptoren.....	17
1.2.3.1 Der TNF-R1-Weg.....	19
1.2.3.2 Der TNF-R2-Weg.....	21
1.3 Die Real-time Reverse-Transkriptase PCR.....	22
1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	25
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Geräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör.....	26
2.1.2 Enzyme und Reaktionskits.....	26
2.1.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.4 Sonstige Materialien.....	28
2.1.5 Software und Hilfsprogramme.....	28
2.1.6 Datenbanken.....	28
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Allgemeine Arbeitsweisen und -bedingungen.....	28

2.2.2 RNA-Isolation und Reverse Transkription.....	29
2.2.2.1 Leukozytenisolation.....	29
2.2.2.2 RNA-Isolation.....	30
2.2.2.3 cDNA-Synthese.....	31
2.2.3 Messung der Genexpression mittels quantitativer Real-time PCR.....	32
2.2.3.1 Methodik der quantitativen Real-time RT-PCR.....	32
2.2.3.2 Quantifizierungsprinzipien.....	32
2.2.3.3 Das LightCycler System.....	33
2.2.3.4 Die Herstellung der Oligonukleotide.....	34
2.2.3.5 Die Herstellung der Plasmidstandards als externe Kontrolle.....	36
2.2.3.6 Fluoreszenzbasierte Detektionsformate.....	37
2.2.3.7 Optimierung der PCR-Reaktion.....	45
2.2.3.8 Erstellung der Standardkurven.....	46
2.2.3.9 Die relative Quantifizierung mittels PBGD.....	46
2.2.3.10 Die Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese.....	47
2.2.4 Die Kollektive.....	49
2.2.4.1 Demografische und immunologische Daten.....	50
2.2.5 Statistische Auswertung.....	51

### **3 Ergebnisse..... 52**

3.1 Vergleich der drei Kollektive mit unterschiedlicher MS-Verlaufsform und des Gesundenkollektivs.....	52
3.1.1 Betrachtung der Kollektive in Hinsicht auf Alter und Geschlecht .....	52
3.1.2 Genexpression des Parameters TRADD.....	55
3.1.3 Genexpression des Parameters FADD.....	57
3.2 Vergleich der MS-Kollektive.....	59
3.2.1 Betrachtung der MS-Kollektive hinsichtlich des Alters.....	59
3.2.2 Betrachtung der MS-Kollektive hinsichtlich des Geschlechts.....	61
3.2.3 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf die Krankheitsdauer.....	62
3.2.4 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf Baseline und EDSS.....	63
3.2.5 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf den Progressionsindex.....	64
3.2.6 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf die Schubanzahl.....	65
3.2.7 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf TRADD.....	66
3.2.8 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf FADD.....	67
3.3 Betrachtung des RR-Kollektivs im Verlauf .....	68
3.3.1 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf den EDSS.....	68
3.3.2 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf TRADD.....	70

3.3.3 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf FADD.....	72
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>74</b>
4.1 Zytokine und Multiple Sklerose.....	74
4.2 Betrachtung der 4 Kollektive.....	80
4.2.1 Betrachtung der 4 Kollektive in Hinsicht auf Alter und Geschlecht.....	80
4.2.2 Betrachtung der 4 Kollektive in Hinsicht auf TRADD.....	81
4.2.3 Betrachtung der 4 Kollektive in Hinsicht auf FADD.....	82
4.3 Betrachtung der MS-Kollektive.....	84
4.3.1 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf die Krankheitsdauer.....	84
4.3.2 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf den EDSS.....	84
4.3.3 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf den Progressionsindex.....	85
4.3.4 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf die Schubanzahl.....	85
4.4 Betrachtung des RR-Kollektivs im Verlauf.....	86
4.4.1 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf den EDSS.....	86
4.4.2 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf TRADD und FADD.....	87
4.5 Schlussfolgerung.....	88
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>90</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>92</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>103</b>
8.1 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen.....	103
8.2 Curriculum vitae.....	105
8.3 Danksagung.....	106

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Multiple Sklerose**

Die Multiple Sklerose (MS) zählt zu den häufigsten Gründen chronisch neurologischer Behinderungen im jungen bis mittleren Erwachsenenalter [1]. Weltweit können aktuell etwa 2,5 Millionen Patienten gezählt werden, welche an dieser Erkrankung leiden [2]. Eine Charakteristik ist das erhöhte Krankheitsvorkommen bei Frauen und in der nordeuropäischen Population [1]. Bereits vor 160 Jahren wurden Krankheitszustände beschrieben, welche rückblickend heute wohl als MS bezeichnet werden könnten [3].

### **1.1.1 Historische Entwicklung**

Schon um 1830 wurden durch Cruveilhier (1829) und fast zur gleichen Zeit durch Carswell (1838) die ersten zwei Aufzeichnungen publiziert, welche eine Erkrankung beschreiben die sich durch multiple, irreguläre Entfärbungen bei der histologischen Darstellung und Degenerationsfoki in der gesamten Neuroaxis darstellte [3]. Etwa 30 Jahre später gelang es schließlich dem französischen Neurologen und Begründer der modernen Neurologie Jean-Martin Charcot (1868) die ersten klinisch-pathologischen Korrelationen zwischen Läsionen des zentralen Nervensystems (ZNS) und einer Erkrankung, welche er als „la sclérose en plaques“ bezeichnete, aufzuzeigen [3]. Durch seine zahlreichen, unter der Mithilfe von Bourneville und Guerard (1868) illustrierten Publikationen und Lehrveranstaltungen, wurde die Enzephalomyelitis disseminata ein immer häufiger erkanntes Leiden. Die durch die Arbeit von Charcot und die pathologischen Illustrationen von Bourneville und Guerard dargestellte Erkrankung kennzeichnet auch heute noch das Bild der klassischen MS [3]. Jedoch wurde hierbei die axonale Komponente der Pathogenese größtenteils außer Acht gelassen und somit blieb die Frage der axonalen Zerstörung bei dieser Erkrankung für lange Zeit unbeantwortet [4]. Zwischen den 1930er und den 1940er Jahren wurde durch Entwicklung experimenteller Tiermodelle der disseminierenden Enzephalomyelitis, wie zum Beispiel des Modells der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE), welche die MS als eine primär inflammatorische demyelinisierende Erkrankung verstanden [4]. Durch die Entwicklung der elektronenmikroskopischen Untersuchung ergab sich schließlich ab den 1960er Jahren die Möglichkeit, Erkenntnisse zu pathologischen Veränderungen zu gewinnen und somit das Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung stetig zu erweitern [3]. So konnten unter



anderem in den ersten durchgeführten Studien die spezifischen, mit den MS-Läsionen assoziierten Zell-Typen dargestellt und dokumentiert werden [5-7]. In den 1980er Jahren wurde die immunhistochemische Analyse auch auf dem Gebiet der MS-Forschung etabliert und ermöglichte durch die Untersuchung der Funktion des Immunsystems und der Inflammationsprozesse den Wissensstand zur Pathogenese der MS stetig zu erweitern [3;8]. In zahlreichen Studien wurde anhand immunhistochemischer Untersuchungen der MS-Plaques dargestellt, dass in frischen MS-Läsionen des ZNS T-Zellen und Makrophagen, jedoch in älteren und chronischen Defekten sowie entlang der Blutgefäße, Plasmazellen dominierten [3;9]. Desweiteren wurden in den folgenden Jahren vielfach Studien zu Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke sowie proinflammatorisch bedingten Endothelveränderungen, spezifischen Zytokinen und weiteren Molekülen des Immunsystems durchgeführt [3]. Auch heutzutage stellen Untersuchungen zur Pathogenese und den immunologischen Hintergründen der MS einen Anteil der aktuellen Forschung dar. Trotz stetig wachsender Erkenntnisse auf diesem Gebiet bleibt die disseminierende Enzephalomyelitis ein bislang hinsichtlich der Pathophysiologie nicht völlig geklärtes Krankheitsbild [4].

### **1.1.2 Definition und Bedeutung**

Heutzutage wird die MS als der Prototyp der immunvermittelten demyelinisierenden Erkrankungen des humanen Zentralen Nervensystems verstanden [2]. Bei der Enzephalomyelitis disseminata handelt es sich um eine inflammatorische Entmarkungserkrankung, welche speziell das Gehirn und das Rückenmark befällt und gehäuft im Alter von 20 bis 40 Jahren zum ersten Mal auftritt [10]. Nach aktuellen Schätzungen gibt es weltweit etwa 2,5 Millionen Menschen, welche von dieser Krankheit betroffen sind [2;4]. Die Erkrankung tritt dabei gehäuft unter jungen Frauen auf [11]. Dabei liegt die Geschlechtsverteilung dieser Erkrankung im Verhältnis Frau zu Mann bei etwa 2:1 [12]. Die Ätiologie der Erkrankung erscheint bis heute ungeklärt. Jedoch deuten Befunde heutiger Studien eine multifaktorielle Krankheitsentstehung an [10]. So scheinen sowohl genetische Faktoren, als auch Umwelteinflüsse wie virale Infektionen an der Pathogenese der MS beteiligt zu sein [1]. Es handelt sich jedoch bei der MS nicht um eine Erbkrankheit im klassischen Sinne mit Erbgängen nach den Mendel'schen Regeln. Vielmehr scheint es eine Reihe genetischer Polymorphismen zu geben, welche mit einem mehr oder weniger erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen [1]. Hierbei scheint zum Beispiel das HLA-DRB1-Gen

besonders mit einem Risiko für die Entstehung der disseminierenden Enzephalomyelitis assoziiert zu sein [13]. Darüber hinaus scheinen, wie bereits erwähnt, ökologische Faktoren bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle zu spielen [10]. So wird unter anderem angenommen, dass Infektionen mit dem Epstein-Barr Virus vor dem 18. Lebensjahr mit einem erhöhtem Risiko an MS zu erkranken, einhergehen könnten [14]. Darüber hinaus ist in Mortalitätsstudien gezeigt worden, dass die Erkrankungshäufigkeit einer Population von der geografischen Verteilung und der ethnischen Zusammensetzung abhängt [15;16]. So ist die Prävalenz in der äquatorialen Zone deutlich geringer als in den nördlichen und südlichen Breitengraden [17]. Zudem ergab sich durch epidemiologische Studien in den Vereinigten Staaten der Hinweis, dass die MS bei der afroamerikanischen Bevölkerung und der Bevölkerungsgruppe der Hispanics wesentlich seltener auftritt [18]. Der Beginn der Erkrankung stellt sich häufig im jungen Erwachsenenalter ein [12]. Die MS führt zu beträchtlichen körperlichen und im Verlauf auch kognitiven Behinderungen durch Ausfälle der sensiblen, motorischen, autonomen und auch neurokognitiven Funktionen und ist in Europa und Nordamerika der häufigste Grund neurologischer Invalidität nichttraumatischer Ursache im jungen Erwachsenenalter [4;10]. Zu beachten ist auch die sozioökonomische Bedeutung dieser chronischen Erkrankung, welche sich aus der früh stattfindenden Manifestation ergibt. Einschränkungen in diesem Bereich, vor allem in der Altersgruppe der jungen Erwachsenen, werden nur noch durch Behinderung in Folge von Traumata übertroffen [10]. Etwa 50% der MS-Erkrankten sind nach zehnjährigem Krankheitsverlauf nicht mehr in der Lage ihren Lebensunterhalt zu verdienen sowie sich selbst häuslich zu versorgen. 25 Jahre nach Krankheitsbeginn sind etwa die Hälfte der Patienten in der stationären Versorgungseinrichtungen untergebracht [4]. Die Lebenserwartung bei MS-Patienten ist um etwa sechs bis zehn Jahre im Vergleich zu Gesunden ähnlichen Alters verkürzt [19]. Die häufigste Todesursache stellen respiratorische Erkrankungen dar [15]. Der klinische Verlauf der MS stellt sich jedoch äußerst heterogen dar. Zudem zeigt sich der Krankheitsprozess zu großen Teilen als klinisch unauffällig. Somit werden MS-Patienten aufgrund des Krankheitsauftretens im jungen Erwachsenenalter und der Ungewissheit über die Progression des Krankheitsverlaufs in ihren beruflichen und persönlichen Entscheidungen durch die Diagnose einer disseminierenden Enzephalomyelitis stark beeinflusst [4].

### **1.1.3 Das klinische Bild der MS**

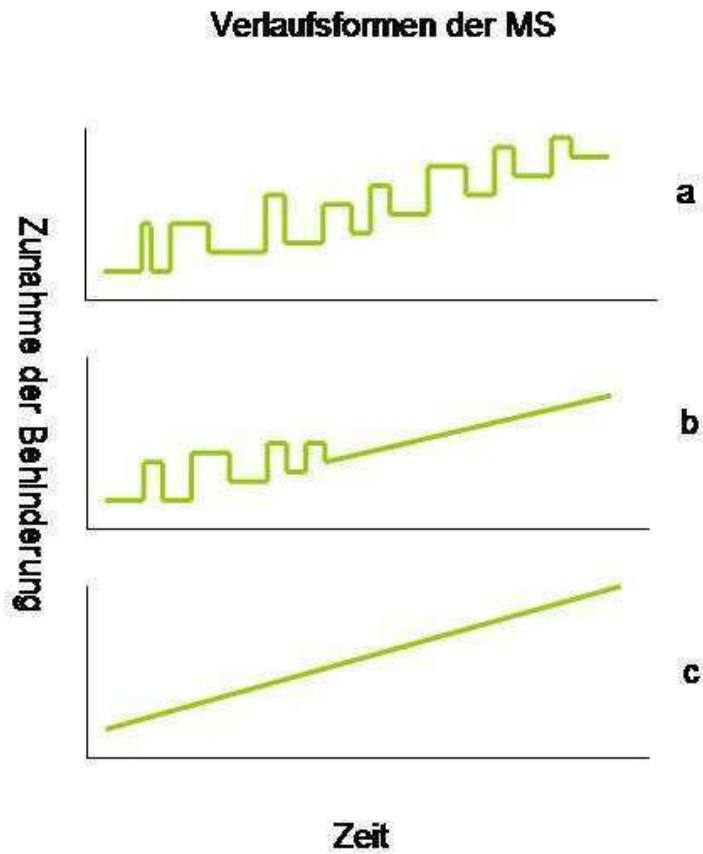
#### **1.1.3.1 Die klinischen Symptome**

Schübe und Progression sind die zwei grundsätzlichen klinischen Phänomene, welche die MS ausmachen [20]. Die klinischen Symptome werden durch Unterbrechungen der myelinisierten Anteile des ZNS verursacht, die peripheren Nervenleitbahnen werden durch die Erkrankung nicht beeinträchtigt. Die häufigsten Initialsymptome stellen sich hierbei u.a. als Schwächegefühle und Minderung der Geschicklichkeit der Extremitäten, aber auch durch Störungen der Sensibilität dar. Zudem kommen auch sensorische Störungen wie die Neuritis nervi optici mit Sehinderung auf einem Auge, Diplopie, Gangunsicherheit und Ataxie als beginnende Symptomatik vor [21]. Der Beginn kann hierbei abrupt sein, typischer ist jedoch ein schleichendes Auftreten. Die Schwere der Symptomatik ist dabei ebenfalls von großer Spannweite. So können frühe Symptome der Erkrankung sich äußerst akut oder eben auch nur sehr still äußern, so dass Patienten für Monate oder Jahre keine ärztliche Hilfe in Anspruch nehmen [1]. Mit Fortschreiten der Erkrankung treten bei vielen Patienten desweiteren Blasendysfunktion, Fatigue, sowie Temperatursensibilitätsstörungen auf. Begleitsymptome wie das Lhermitte-Zeichen, hemifaciale Empfindungsstörungen, Schwindel, Kopfschmerzen und andere paroxysmale Symptome werden ebenfalls häufig beschrieben. Vor allem bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf treten häufig kognitive Defizite wie Einschränkungen im Erinnerungsvermögen, Aufmerksamkeitsstörungen, Verlangsamung der Denkprozesse und Schwierigkeiten bei Problembewältigung auf. Zudem werden bei etwa 60% der MS-Patienten depressive Störungen im Verlauf der Erkrankung diagnostiziert [1;22].

#### **1.1.3.2 Die unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung**

Heutzutage werden verschiedene Verlaufsformen der MS unterschieden: die primär chronisch progressive MS-Form (primär progrediente MS, RRMS) und die MS mit sekundär chronisch progredientem Erkrankungsverlauf (SPMS) [23;24]. Bei schätzungsweise 85% der MS-Patienten beginnt die chronische Krankheit mit rezidivierenden und reversiblen neurologischen Defiziten. Dieser Erkrankungsverlauf kommt bei Frauen doppelt so häufig wie bei Männern vor [4]. Die Erkrankungsschübe dauern zumeist nicht länger als ein paar Monate an und die Patienten erlangen nach diesen Phasen ihre neurologischen Fähigkeiten wieder. Die Häufigkeit der Schübe variiert dabei individuell von Patient zu Patient. Im Mittel erleben die Erkrankten etwa ein bis zwei solche Episoden pro Jahr. Die Dauer des schubförmigen Stadiums der MS kann hierbei zwischen einzelnen Jahren bis zu Jahrzehnten

betragen [4]. Nach längerer Krankheitsdauer folgt dieser schubförmigen Verlaufsform gehäuft eine Phase von progredientem Erkrankungsverlauf mit oder ohne weitere Schübe (SPMS) [8;25;26]. Die Häufigkeit der Schübe zu Beginn der MS beeinflusst hierbei den Zeitpunkt des Eintritts in den chronischen Abschnitt der Erkrankung. Ist aber ein gewisser Schwellenzustand der Invalidität erreicht, wird das weitere Fortschreiten der Behinderung nicht mehr durch Erkrankungsschübe beeinflusst [25;27]. Ist einmal die progressive Phase erreicht, ist das Voranschreiten der Erkrankungssymptomatik sowohl bei der primären wie auch bei der sekundären Form von etwa gleichem Ausmaß [25-27]. Bei etwa 10%-15% der Patienten fehlt jedoch die schubförmige Phase am Anfang und die Erkrankung nimmt von Beginn an einen voranschreitenden Verlauf (PPMS) [10]. Ferner können Sonderformen dieser Krankheit äußerst selten sehr akut und fulminant verlaufen, und innerhalb weniger Monate nach Beginn zum Tode führen (Akute MS vom Marburg-Typ, AMS) [27]. Im akuten und schubförmigen Stadium der MS haben immunmodulatorische und immunsuppressive Therapiemöglichkeiten positive Auswirkungen auf die Erkrankung. Im Verlauf der progressiven Phase der Erkrankung zeigen sich diese Behandlungsformen nur noch wenig effektiv [28]. Diese Gegebenheiten deuten an, dass es pathogenetische Unterschiede der zerebralen Schädigung zwischen dem schubförmigen Abschnitt und dem chronisch fortschreitenden Abschnitt der Krankheit geben könnte [27].



**Abbildung 1.1: Die verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose**

**a:** Schubförmige Multiple Sklerose (RR-MS)

*Erkrankungsschübe führen zu Einschränkungen, welche sich zum Teil oder ganz zurückbilden können*

**b:** Sekundär chronische Multiple Sklerose ( SP-MS)

*Nach anfänglich schubförmigem Verlauf kommt es ohne weitere erkennbare Erkrankungsschübe und Rückbildung der Symptome zu einer Zunahme der Behinderung*

**c:** Primär chronische Multiple Sklerose ( PP-MS)

*Ohne erkennbare Erkrankungsschübe kommt es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung des Zustandes*

### **1.1.3.3 Expanded Disability Status Scale (EDSS)**

Einen wichtigen Aspekt in der klinischen Diagnostik stellen Versuche dar die individuelle Beeinflussung der Patienten durch die MS zu bemessen und somit deutlich zu machen. Die neurologische Beeinträchtigung der Erkrankten steht hierbei im Mittelpunkt der Untersuchung. Diese kann anhand von Skalen eingeteilt werden [29]. Hierbei lassen sich mehrere solcher Leistungsskalen finden, die Geläufigste ist hierbei die Expanded Disability Status Scale nach Kurtzke (EDSS) [30].

In der hier vorliegenden Arbeit ist die Einschätzung des klinischen Status der untersuchten Patienten ebenfalls anhand der EDSS durchgeführt worden. Der Grad der Behinderung wird dabei durch die klinische Untersuchung der einzelnen neurologischen Qualitäten wie Motorik, Sensibilität, sowie durch Beurteilung der sensorischen und autonomen Leitungsbahnen sowie der Kleinhirnfunktion, Hirnstamm- und Sehbahnfunktion festgestellt und anhand der Skala bewertet. Somit kann indirekt die Aktivität der Erkrankung eingeschätzt werden. Die Skala hilft den Grad der Beeinträchtigung zahlenmäßig zu erfassen. Damit kann der Verlauf der Krankheit beurteilt werden. Darüber hinaus können bei Erstellung klinischer Studien anhand der Skala homogene Patientengruppen ermittelt, oder auch Ergebnisse einer Behandlung quantitativ erfasst werden [30]. Die Skala ist in 0,5er Schritten eingeteilt und erstreckt sich von 0,0 (normale neurologische Untersuchung) bis zum maximalen Wert von 10,0 Punkten bei Tod des Patienten infolge der MS.

### **1.1.4 Aktuelles Verständnis der Pathogenese**

In der aktuellen Literatur wird die MS als eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS mit einer aktiven Immunkomponente beschrieben [24]. Im pathologischen Sinne handelt es sich bei der disseminierenden Enzephalomyelitis um eine chronisch entzündliche Erkrankung des ZNS, welche zu herdförmigen entmarkenden Läsionen der weißen und grauen Substanz führt [28;31]. Schübe der Krankheitsaktivität und das Fortschreiten der Symptome sind dabei die zwei grundsätzlichen klinischen Phänome der MS. Es wird angenommen, dass die Erkrankungsschübe klinisch den akuten entzündungsbedingten Läsionen des ZNS entsprechen. Die Progression der Krankheit dagegen scheint die chronische Entmarkung, die Gliose und den Verlust axonalen Gewebes histopathologisch wiederzuspiegeln. Darüber hinaus scheint das Fortschreiten der Erkrankung durch die Balance zwischen neuronaler Schädigung und den Reperaturmechanismen bestimmt zu sein [20].

Die demyelinisierten Plaques scheinen ebenfalls ein pathologisches Kennzeichen der MS zu sein. Dabei handelt es sich um Bereiche, welche durch eine entzündungsbedingte Zerstörung der Markscheiden und anschließende Vernarbung durch eingewanderte nichtneuronale Zellen, wie dem Knochenmark entstammende Mikroglia, gekennzeichnet sind [12]. Neben der primären Entmarkung scheinen die Plaques auch eine diffuse Gewebeschädigung einer normal erscheinenden weißen und grauen Substanz aufzuweisen [31]. Bei Fortschreiten der Läsionen können auch Axone welche innerhalb der entmarkten Plaques liegen von der Schädigung betroffen sein. Diese sind jedoch in einem weitaus geringeren Ausmaß als die myelinisierten Markscheiden von den Veränderungen betroffen [12]. Grundsätzlich scheinen die neurologischen Ausfälle, welche durch Entzündung und Demyelinisierung hervorgerufen worden sind, teilweise reversibel zu sein. Ist jedoch die Schwelle der Kompensation einmal überschritten, führen axonale Zerstörung und neuronaler Abbau im Gegensatz dazu immer zu einer irreversiblen Schädigung [32].

#### **1.1.4.1 Die Remyelinisierungsprozesse**

Anfängliche Remyelinisierungsprozesse können häufig in aktiven MS-Plaques beobachtet werden. Desweiteren besteht allgemein die Meinung, dass diese Remyelinisierung gar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in chronischen Läsionen auftritt. Zudem scheint es eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Remyelinisierung und der Dauer der Erkrankung oder der Erkrankungsdauer bis zum Tod der Patienten zu geben. Jedoch scheint es aber auch große individuelle Unterschiede bezüglich der Regenerationsfähigkeit der Läsionen zu geben. Die Frage der Kompensationsprozesse bei der MS scheint demnach kein allgemeines Problem der Reperatur der Myelinscheiden zu sein. Vielmehr könnte sich die axonale Remyelinisierung während der aktiven entzündlichen Phase der Erkrankung als instabil erweisen [31].

#### **1.1.4.2 Aktive und chronische Läsionen**

Die akute MS-Läsion wie sie im schubförmigen Stadium der Erkrankung zu finden ist, ist durch perivaskuläre Infiltration mononukleärer Zellen wie T-Zellen und Makrophagen, sowie von Vorherrschen einer von Makrophagen vermittelten Demyelinisierung gekennzeichnet [2;33]. Innerhalb dieser Plaques herrscht neben dem Verlust von Oligodendroglia auch ein Verlust axonalen Gewebes [34]. Zudem scheinen die entzündlichen Prozesse auch von einer Störung der Blut-Hirn-Schranke begleitet zu sein [35]. So lässt sich in aktiven MS-Plaques

eine lokale Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, sowie ihrer zugehörigen Rezeptoren nachweisen [8]. Bald darauf erfolgt eine Wiederauffüllung der Plaques mit oligodendrogialen Voläuerzellen sowie eine fortschreitende Remyelinisierung der frischen Läsion [2;36]. Im progressiven Stadium der Krankheit, wie es bei der SPMS oder der PPMS vorliegt, stellt sich das pathologische Bild jedoch anders dar [8]. Obwohl in diesem Stadium immer noch fokale Läsionen der weißen Substanz vorhanden sind, scheinen die klassischen entmarkten Plaques seltener auffindbar. Chronisch aktive MS-Läsionen stellen sich scharf begrenzt und von perivaskulären mononukleären Zellansammlungen, sowie von myelinbeladenen Makrophagen umgeben dar. Innerhalb der chronisch aktiven Plaques lassen sich auch Demyelinisation und axonale Schädigung, sowie reaktive Astrozyten und Ansammlungen von Immunglobulinen ausmachen [37]. Die chronischen MS-Plaques zeigen im Gegensatz dazu häufig ein hypozelluläres Bild. Weiterhin weisen diese Läsionen neben entmarkten Axonen auch eine fibröse Astrozytose sowie einen Mangel an Oligodendroglia auf [37]. Neben den Veränderungen der weißen Substanz kommt es auch zu einer erheblichen Schädigung des Kortex [38]. Es konnte hierbei sowohl im Vorderhirn als auch im Zerebellum eine starke Ausdehnung der kortikalen Demyelinisierung festgestellt werden. Diese Entmarkung nahm dabei in extremen Fällen bis zu 60% der gesamten kortikalen Fläche ein [27]. Diese pathologischen Veränderungen stimmen jeweils mit den in ausführlichen kernspintomographischen Untersuchungen erbrachten zerebralen Befunden überein [8]. Laut neuesten Studien scheint jedoch im pathologischen Aufbau der Läsionen eine große Variabilität vorzuherrschen [39;40].

Heutzutage wird es jedoch immer klarer, dass viele der Mechanismen welche bei der Demyelinisierung und Neurodegeneration eine Rolle spielen, in mehrfacher Weise und parallel zueinander wirken. Darüber hinaus scheint ein Großteil dieser Prozesse auch einen Einfluss auf die Regulierung und Ausbreitung der Immunreaktion zu haben [31]. So wird auch diskutiert ob die MS als eine primär neurodegenerative Erkrankung des ZNS mit einer erst sekundär durch entzündliche Prozesse angeregten Demyelinisierung betrachtet werden sollte [4;12].

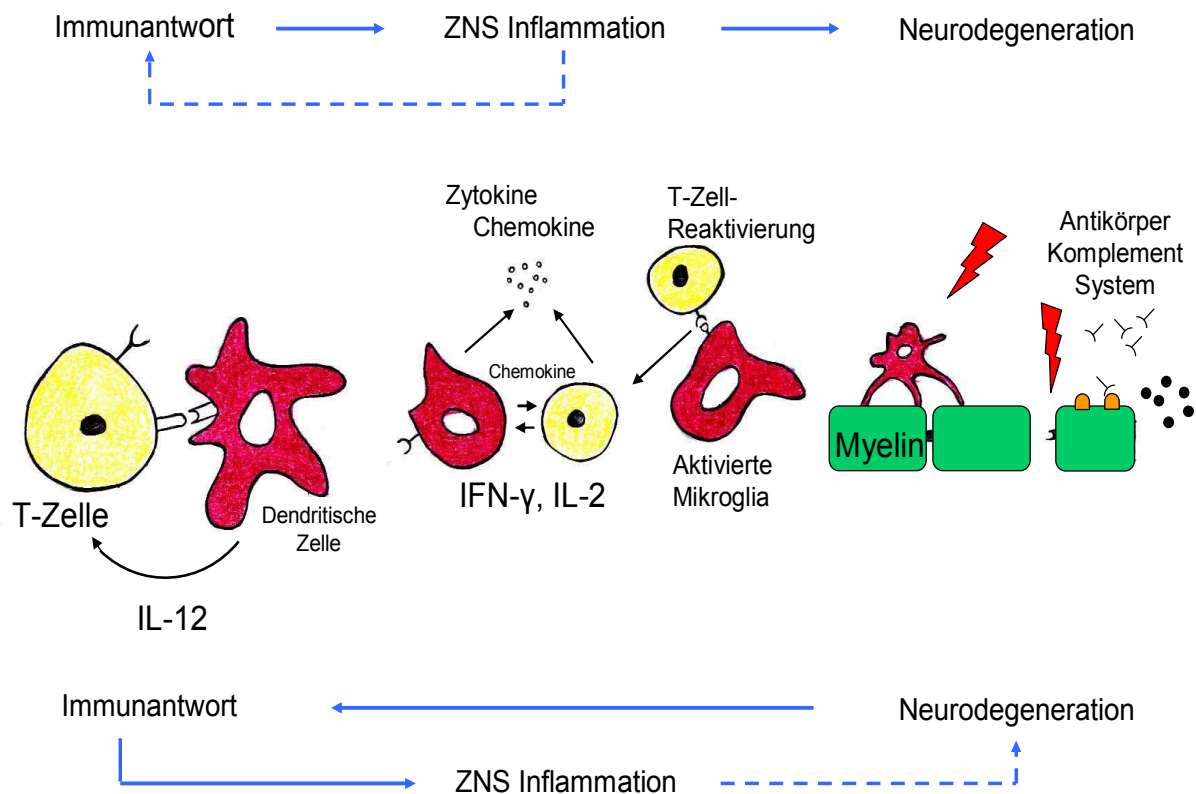
### **1.1.5 Aktueller immunologischer Forschungsstand**

Wie bereits beschrieben stellt sich das Spektrum der strukturellen und immunologischen Veränderungen der MS-Läsionen bei verschiedenen Patienten, sowie den unterschiedlichen Krankheitsstadien und -formen sehr breit dar. Damit ergeben sich Hinweise dass die



Mechanismen dieser Gewebeveränderungen heterogener Genese sind und inter- sowie intraindividuellen Unterschieden unterliegen [8]. Anhand experimenteller neuroimmunologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die entzündlichen Entmarkungsherde der Erkrankung durch eine Reihe unterschiedlicher Immunmechanismen induziert werden können. Diese Faktoren umfassen unter anderem zytotoxische T-Zellen, spezifische Antikörper, Mechanismen angeborener Immunität sowie eine genetisch bedingte Anfälligkeit des Zielgewebes [8]. Möglicherweise werden autoreaktive CD4<sup>+</sup> T Zellen durch die Erkennung bestimmter Signale, zum Beispiel viraler Peptide in der Peripherie aktiviert. Darüber hinaus sind weitere Einflußfaktoren, wie das Ausmaß der Aktivierung, Zytokine oder ein infektiöser Zusammenhang an dem proinflammatorischen Geschehen beteiligt [10]. Anschließend können die aktivierten autoreaktiven T-Zellen über bestimmte Adhäsionsmoleküle (LFA-1 und VLA-4) am Endothel der Bluthirnschranke anhaften und durchwandern diese mit Hilfe zerebrovaskulärer endothelialer Zellen in das zerebrale Parenchym. Hierbei scheinen noch etliche Mechanismen der Transmigration ungeklärt. Anschließend werden durch proinflammatorische Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-23, LT) und Chemokine die residenten Zellen wie Mikroglia oder Astrozyten aktiviert. Weiterhin werden so auch andere Zellen des Immunsystems wie etwa CD4<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen oder Monozyten aus der Peripherie rekrutiert und die Ausbildung der Entzündungsherde angeregt [10]. Dabei kann bereits in diesem frühen Stadium der Entzündungsreaktion eine Schädigung des neuronalen Gewebes, wie etwa der Myelinscheiden und der Oligodendrozyten oder der Axone auftreten. Während dieser anfänglichen Schritte der Erkrankung scheinen die CD4<sup>+</sup> autoreaktiven T-Zellen den Prozess anzutreiben. In den folgenden Phasen hingegen scheinen diese Zellen nur eine untergeordnete Rolle einzunehmen. Darüber hinaus könnte die neuronale Schädigung durch zahlreiche weitere Prozesse, wie die Ablagerung von Radikalen, Zytokinen wie TNF $\alpha$ , Komplementfaktoren oder auch durch Antikörper vermittelte Aktivierung des Komplementsystems und antikörperinduzierte zelluläre Zytotoxizität veranlasst werden. Weiterhin könnten eine Phagozytose des Myelins, eine durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten induzierte direkte axonale Schädigung, die Sekretion von Proteaseenzymen und ein induzierter Untergang von Oligodendrozyten an der Degeneration des Gewebes beteiligt sein [10]. Nach Ablauf der akuten Inflammation kommt es zu einer Auflösung der Herde, welche durch die Beseitigung von Debris und ein Vorherrschen antiinflammatorisch wirksamer Zytokine und von der Sekretion von Wachstumsfaktoren durch die residenten neuronalen Zellen und T-Zellen bestimmt wird. Anschließend beginnt die Remyelinisierung der entmarkten Herde durch noch erhaltene Oligodendrozyten. Jedoch

scheint hierbei die ursprüngliche Stärke der Markscheiden nicht mehr erreicht zu werden, was zu einer Verlangsamung der Weiterleitungsgeschwindigkeit in den reparierten Arealen führt. Im Verlauf der Erkrankung verändert sich der zelluläre Aufbau der Herde auf dramatische Art und Weise. Chronische Erkrankungsherde können zwar ebenfalls geringe entzündliche Prozesse aufweisen, stellen sich aber vielmehr durch axonalen und myelinen Verlust, sowie durch zahlreiche Ablagerungen von Narbengewebe und astrozytäre Vermehrung bei einem insgesamt verringertem zellulären Bild dar [10].



**Abbildung 1.2 : Die Immunopathogenese der MS**

**A** Eine Autoimmunantwort führt zu der Schädigung des ZNS mit akutem Entzündungsgeschehen und anschließender Neurodegeneration.

**B** Alternativ könnte eine toxische Schädigung der Zellen des ZNS selbst zu einer Aktivierung von Autoimmunzellen führen. Abbildung modifiziert nach Hauser and Oksenberg, 2006

## **1.2 Die TNF-Rezeptoren, TRADD und FADD**

### **1.2.1 Bedeutung der TNF-Rezeptoren in der Pathoimmunogenese der MS**

Heutzutage wird angenommen, dass das Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) bei der Ausbreitung der Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung bei der MS eine wichtige Rolle spielt [41-43]. TNF $\alpha$  scheint dabei in einem komplexen Wechselspiel mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen eine unmittelbare Effektor-Funktion im humanen und experimentell erzeugten Demyelinisierungsgeschehen einzunehmen [44-46]. So konnte unter anderem anhand von Obduktionspräparaten aufgezeigt werden, dass TNF $\alpha$  innerhalb aktiver MS-Erkrankungs-Herde im Gehirn verstorbener MS-Patienten gefunden werden konnte [47]. Zudem konnte auch ein Ansteigen des TNF $\alpha$ -Proteinpegels im Serum und Liquor von an MS erkrankten Personen ermittelt werden [42;48]. Weiterhin konnte durch in vitro-Studien gezeigt werden, dass das Zytokin eine direkte toxische Wirkung auf Oligodendrozyten zu haben scheint. Zusätzlich hierzu scheint TNF $\alpha$  auch die Proliferation der Astrozyten anzuregen [49]. In einigen Studien konnten auch Zusammenhänge zwischen erhöhten TNF-Spiegeln im Serum und Liquor der MS-Patienten und dem Fortschreiten der Erkrankung nachgewiesen werden [50;51]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass etwa 2 bis 6 Wochen vor der klinischen Manifestation eines Erkrankungsschubes ein Anstieg des mRNA-Niveaus des TNF $\alpha$  in mononukleären Zellen des peripheren Bluts der MS-Patienten auftrat [52]. Zudem wurde festgestellt, dass mononukleäre Blutzellen von MS-Patienten mit aktivem Krankheitsverlauf TNF $\alpha$ -mRNA auf einem generell höheren Niveau exprimieren als Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf oder auch gesunde Kontrollprobanden [52;53]. Darüber hinaus wurden auch die beiden TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNF-R1 und TNF-R2) auf Veränderungen hinsichtlich des Expressionsniveaus untersucht [54]. Hierbei wurden jedoch in zahlreichen Studien teilweise recht unterschiedliche Ergebnisse erhoben. So konnte einerseits eine Erhöhung des löslichen TNF-R1-Levels in Serum und Liquor von MS-Patienten während der akuten Krankheitsschübe ermittelt werden [55;56]. Jedoch konnten andererseits diese Ergebnisse in Folgestudien nicht bestätigt werden oder es ergaben sich kontroverse Daten [53;57-59]. Und auch bei der Untersuchung der Genexpression des TNF-R2 ergaben sich deutlich voneinander abweichende Daten. So konnten zunächst keinerlei Differenzen in Bezug auf die Genexpression des löslichen TNF-R2 im Vergleich der Patienten mit RR-MS und gesunden Kontrollpersonen ermittelt werden [54]. In aktuelleren Folgestudien stellte sich die Ausschüttung des löslichen TNF-R2 bei MS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollprobanden als signifikant erhöht dar [57].

Die Signalwege und das Expressionsniveau des Zytokins und seiner zugehörigen Rezeptoren wurden zudem in Tiermodellen anhand der EAE untersucht. Diese autoimmune demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems kann in Mäusen durch unterschiedliche immunologische Techniken induziert werden und dient aufgrund großer Übereinstimmungen in klinischem und histologischem Bild trotz grundsätzlicher Probleme als etabliertes Tiermodell der MS [60]. Anhand der Tiermodelle konnte zunächst dargestellt werden, dass gesteigerte TNF $\alpha$ -Werte in Serum und Liquor mit den gebotenen klinischen Symptomen übereinstimmten [61]. Zudem schienen auch die TNF-Rezeptoren eine große Rolle in der Pathogenese der EAE zu spielen [62]. Des weiteren wurde auch gezeigt, dass eine Behandlung bei diesem Tiermodell mit dem Zytokin zu einer Verschlechterung der EAE führte [63]. In weiteren Studien konnten die Versuchstiere von einer Behandlung mit TNF- $\alpha$ -Antikörpern profitieren [44;45;64]. Jedoch konnten die, anhand der EAE gewonnenen Erkenntnisse nicht immer auch auf die humane Erkrankung übertragen werden. Teilweise zeigten sich in der Anwendung bei MS sogar konträre Ergebnisse. So schien beispielsweise die Behandlung von MS-Patienten mit Anti-TNF-Rezeptor-Antikörpern eine negative Auswirkung im Sinne einer Krankheitsexazerbation zu haben [41]. Anhand dieser Daten lässt sich erkennen, dass die Beteiligung des TNF- $\alpha$  und seiner Rezeptoren an der Krankheitsentstehung und dem Erkrankungsverlauf der MS äußerst komplex ist, da Zytokine pleiotrope Faktoren darstellen, welche in einem komplizierten Netzwerk weiterer Moleküle interagieren. Somit ergeben sich große Möglichkeiten, neue Erkenntnisse über die Pathogenese der MS im Hinblick auf die TNF-Signalwege auf der Ebene der TNF-Rezeptoren und ihrer intrazellulär assoziierten Faktoren zu ermitteln.

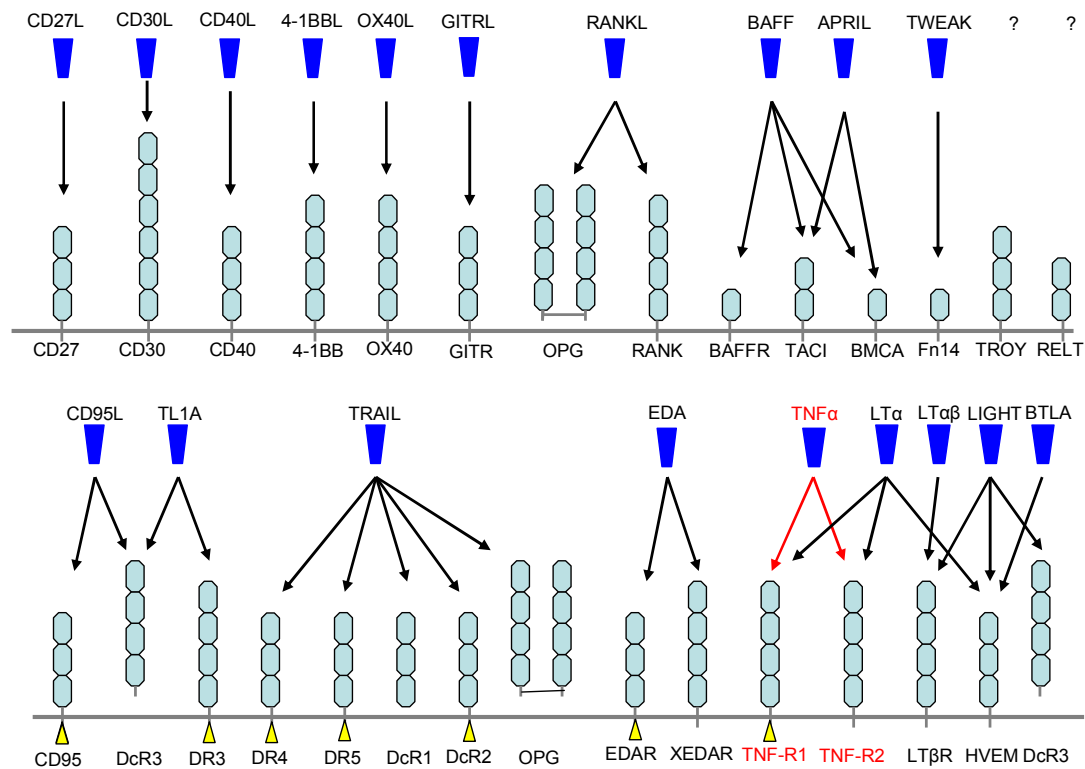
### **1.2.2 Aufbau der TNF-Rezeptor Familie**

Das auch unter dem Namen Kachektin bekannte Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) wurde bereits vor etwa einem Jahrhundert beschrieben. Jedoch gelang erst 1984 die vollständige Sequenzierung des Gens für diesen wichtigen Signalstoff des Immunsystems [65]. Von da an wurde immer offensichtlicher, dass dieser Signalstoff wohl den prototypischen Vertreter einer Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie darstellte. Dieses Zytokinsystem ist an der Regelung wichtiger biologischer Funktionen wie der Organogenese, aber auch an wichtigen Mechanismen der Immunantwort beteiligt [66;67]. Mit der Entwicklung neuer biologisch-technischer Untersuchungsmethoden konnten daraufhin viele weitere Proteine welche mit dieser Zytokinfamilie assoziiert sind, wie Liganden und Rezeptoren bestimmt werden [67].

Heutzutage haben die Erkenntnisse auf dem Gebiet des TNF-Signalnetzwerkes bereits zu der Entwicklung neuartiger Therapiemöglichkeiten chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis geführt [65]. Mittlerweile konnten bereits 19 membrangebundene oder frei lösliche Liganden, sowie 29 Rezeptoren, die ebenfalls in gelöster Form oder membrangebunden vorkommen können, als Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-Superfamilie) identifiziert werden [68]. Die Liganden der TNFR-Superfamilie gehören zum Typ II der Transmembranproteine. Diese zeigen sich als nicht kovalent gebundene, sich selbst zusammenlagernde Trimere [69]. Diese trimere Quaternärstruktur entsteht dabei durch die Homologie der Aminosäuren innerhalb der interagierenden Grenzflächen. Die äußeren Oberflächen weisen allerdings, den individuellen Besonderheiten der jeweiligen Rezeptoren angepasst, nur wenig ähnliche Sequenzen auf [70]. Neben dem wohl bekanntesten Zytokin dieser Familie, TNF- $\alpha$ , gehören unter anderem auch Lymphotoxin (LT) und Nuklear Faktor  $\kappa$ B (Receptor activator of nuklear  $\kappa$ B NF $\kappa$ BR,) und CD95 (FAS) dieser Gruppe an [68]. Einige dieser Liganden, insbesondere TNF- $\alpha$ , sind in der Lage, sowohl in der membranintegrierten Form als auch in Form von gelösten Zytokinen zu interagieren. Diese gelöste Form entsteht dabei durch proteolytische Abspaltung der Proteine von der Zelloberfläche, meist durch Metalloproteasen aufgrund von diversen Stimuli. Wiederum andere Liganden, wie LT $\alpha$ , erscheinen nur als gelöste Moleküle, können sich aber an der Zellmembran als heterotrimere Komplexe verankern und somit die Komplexität und Spezifität der Signalregulierung noch zusätzlich erhöhen [67]. Eine Besonderheit der Liganden ist ihre Fähigkeit sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken zu können, indem sie in gelöster Form die Funktion der Komplexe von Ligand und Rezeptor stören oder potenzieren können. Zumeist erfolgt jedoch die transmembrane Expression dieser Zytokinfamilien-Mitglieder. Somit lässt sich auf eine hauptsächlich lokale Wirkweise schließen. Wenn diese Zytokine gelöst erscheinen, wie etwa unter unphysiologischen Bedingungen, können sie sich als schädlich erweisen [68]. Bei den Rezeptoren dieser Zytokin-Superfamilie handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine, welche mit charakteristischen „cystein reichen Domänen“ (cystein rich domains, CRD) versehen sind. Diese CRD stellen ein besonderes Kennzeichen der Moleküle der TNFR-Superfamilie dar [66]. Sie stellen sich als Pseudobasenwiederholungen dar, welche anhand von Disulfidbrücken der Cysteinreste aufgespannt sind [71]. Die Rezeptoren der TNFR-Superfamilie unterscheiden sich in charakteristischer Weise anhand der Anzahl der CRD. So lassen sich bei manchen Rezeptoren nur eine CRD, bei den TNF-R1 und -R2 drei CRD, bei anderen Mitgliedern bis zu sechs solcher Domänen nachweisen [67]. Zudem lassen sich die

Rezeptoren der TNFR-Superfamilie in zwei wesentliche Gruppen unterscheiden. Diese beinhalten dabei zum einen Rezeptoren, welche sogenannte Todesdomänen (engl.: death domains, DD) aufweisen und somit auch Zelluntergang via Apoptose induzieren können, und zum anderen Rezeptoren die mit dem Molekül „TNF receptor associated factor“ (TRAF) interagieren [72;73]. Diese DD kann über Protein-Protein-Wechselwirkungen und Anregung weiterer DD über die Aktivierung des Moleküls Kaspase 8 zum induzierten Zelltod führen [73;74]. Viele der Liganden können an einen speziellen Rezeptor binden, es finden sich aber auch einige Moleküle dieser Superfamilie, die auch mit mehreren Rezeptoren interagieren können. So können mehrere Rezeptoren durch einen einzigen Liganden angeregt werden. Entsprechendes gilt auch im umgekehrten Falle. Zudem gibt es auch Hinweise, dass die jeweiligen Rezeptoren auch untereinander in Kommunikation stehen und sich gegenseitig beeinflussen können [68]. Die Hintergründe dieser scheinbar zusätzlichen Interaktionen konnten bis heute noch nicht geklärt werden [68]. Die Mehrzahl der TNFR-Superfamilie zugehörigen Moleküle wird zumeist durch Zellen des Immunsystems, vor allem durch B-Zellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und dendritische Zellen exprimiert [67;68]. Die TNF-Rezeptoren werden jedoch von einer Reihe unterschiedlicher Zelltypen des Körpers exprimiert. So konnte zum Beispiel noch kein Zelltyp nachgewiesen werden, welcher nicht den TNF-R1 exprimiert. Der TNF-R2 hingegen wird hauptsächlich durch Zellen des Immunsystems und Endothels, der Rezeptor VEG1 sogar ausschließlich nur von endothelialen Zellen gebildet [68]. Die Interaktion der TNFR-Rezeptoren mit den zugehörigen Liganden führt daraufhin zu Zellproliferation und Differenzierung aber auch zum programmierten Zelltod, Apoptose durch Aktivierung unterschiedlicher Verlaufswege unter Einbezug von NF $\kappa$ B, Januskinasen (JUN N-terminal kinase, JKN) oder MAP-Kinasen (MAPK, p42/p44 mitogen-activated protein kinase) [67;68]. Die Forschung innerhalb der letzten zwanzig Jahre auf diesem Gebiet hat die Erkenntnis erbracht, dass die Aktivitäten dieser Zytokinfamilie sich zum einen günstig erweisen, zum anderen jedoch auch schädlich für den Körper sein können. Denn obgleich es sich hierbei in physiologischen Mengen um wichtige Zytokine handelt, die für adäquate Regulierung im Körper benötigt werden, scheint ihre pathologische Expression äußerst gesundheitsschädlich zu sein [68]. Die eigentlichen biologischen Funktionen umfassen zum einen Mechanismen, welche sich günstig auf das Immungeschehen auswirken, wie die Regulierung des Entzündungsgeschehens und protektive Immunantworten im Falle von Infektionserkrankungen. Zudem nehmen sie eine besondere Rolle in der Organogenese sekundär lymphatischer Organe, sowie der Erhaltung der lymphatischen Strukturen im Körper ein. Andererseits können einige Mitglieder der

TNFR-Familie, und insbesondere der TNF, an schädigenden Effekten wie Sepsis, Fieber, Kachexie und Autoimmunerkrankungen wesentlich beteiligt sein [67].



**Abbildung 1.3 : Der Aufbau der TNF/TNF-Rezeptor-Superfamilie**

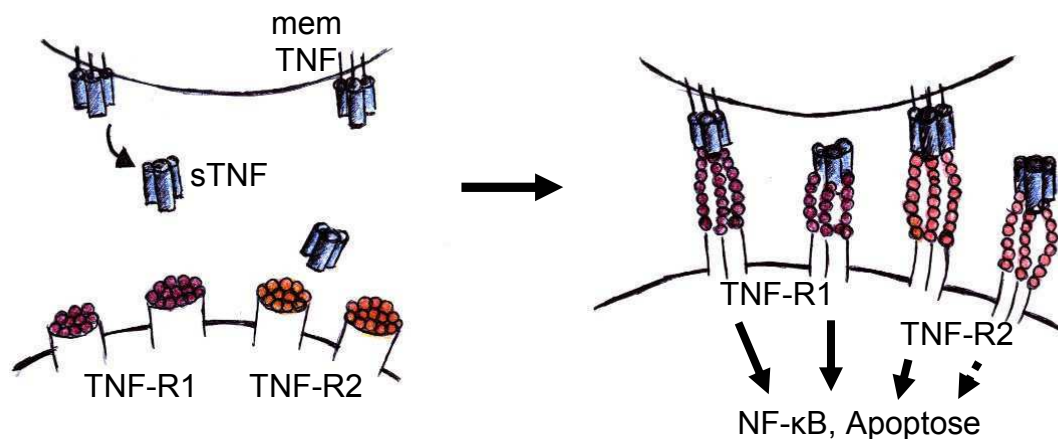
Die Mitglieder dieser großen Gruppe bestehen aus zytoplasmatischen wie auch an der Zelloberfläche verankerten Rezeptoren sowie ihren zahlreichen Liganden. So unter anderem auch TNFα und die Rezeptoren TNF-Rezeptor-1 und -2. Abbildung modifiziert nach Hehlgans and Pfeffer, 2005.

### 1.2.3 Die TNF-Rezeptoren

Die Signalwirkung des Zytokins TNF $\alpha$  wird durch zwei bestimmte die an der Zelloberfläche gelegenen Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 vermittelt [54] [75]. Beide sind transmembrane Glykoproteine und weisen mehrere CRD im extrazellulär gelegenen Anteil auf. Die beiden Rezeptoren können sowohl als membrangebundene Moleküle, aber auch in ihrer freien, von der Zelloberfläche gelösten Form mit dem Zytokin interagieren [75]. Weiterhin können beide Rezeptoren auf den Oberflächen aller Zelltypen außer der Oberfläche von Erythrozyten vorgefunden werden. Dabei wird der TNF-R2 jedoch hauptsächlich in größeren Mengen von Endothel und hämatopoetisch abstammenden Zellen exprimiert. Zudem scheint er eher induzierbar zu sein. Das Auftreten des TNF-R1 ist hingegen weiter verbreitet und erscheint eher konstitutiv. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich aber auch signifikant hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität gegenüber dem Zytokin TNF- $\alpha$ , sowie auch im Hinblick auf ihre intrazellulären Signalwege [76]. Warum jedoch zwei Rezeptoren mit dem Zytokin interagieren können ist bis dato noch nicht hinreichend erklärt [75]. Durch die Bindung an die Rezeptoren wird eine Serie von Ereignissen ausgelöst, welche schließlich zu einer Aktivierung der zwei hauptsächlichsten Transkriptionsfaktoren, NF- $\kappa$ B und c-Jun führen. Diese Transkriptionsfaktoren sind für die Induktion der Expression gewisser Genabschnitte verantwortlich. Somit werden äußerst wichtige biologische Prozesse, wie etwa Zellwachstum und Zelltod, Onkogenese sowie Immun-, Stress- und Entzündungsreaktionen eingeleitet [65]. Die intrazellulären Domänen (ICD) der beiden TNF-R1 und -R2 führen zu ihrer Einteilung in die zwei bereits erwähnten Subgruppen der TNFR-Familie. Der Gruppe der Rezeptoren welche eine DD enthalten und die Gruppe der Rezeptoren welche mit dem Adapterprotein TRAF interagieren. Die ICD besitzen dabei jedoch keine eigene Enzymaktivität [74]. Der TNF-R1 weist dabei eine als DD bezeichnete Protein-Protein-Interaktionsdomäne auf, welche weitere DD-beinhaltende Proteine bindet. Damit kann der induzierte Zelltod eingeleitet werden. Parallel hierzu kann der TNF-R1 auf indirektem Wege die Genexpression auch über eine Interaktion mit Proteinen der TRAF-Familie beeinflussen [77]. Der TNF-R2 hingegen reguliert direkt über Interaktion mit TRAF2 die Genexpression. Dabei steht er aber auch in einer intensiven Kommunikation mit dem TNF-R1 [73]. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt erwähnt, können die TNF-Rezeptoren sowohl als membrangebundene Proteine oder als von der Zelloberfläche abgelöste Moleküle agieren. Lange Zeit wurde angenommen dass die einzige physiologische Funktion dieser löslichen Moleküle die Kontrolle der biologischen Aktivität ihres Liganden TNF- $\alpha$  durch Neutralisation des Zytokins darstelle [78]. Als gelöste Rezeptoren scheinen sie jedoch zusätzlich zu ihren intrazellulären Interaktionen auch in der



Lage zu sein, einen sogenannten „reversen Signalweg“ einzuschlagen. Hierbei stellt sich dar, dass durch Mitglieder der TNF-Superfamilie nicht nur die Signalverbreitung über angeregte TNF-Rezeptoren, sondern auch über Vermittlung von als Liganden wirkenden TNF-Rezeptoren zustande kommen kann. Dieser Signalweg wird demnach als „reverse signalling“ bezeichnet [79]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass das lösliche TNF-R1 (sTNF-R1) die Apoptose von Monozyten induzieren kann. Dabei scheint der gelöste Rezeptor membranständiges TNF- $\alpha$ , welches von diesen Zellen in großem Maße exprimiert wird, zu binden. Die Signalkaskade des so induzierten Zelltodes scheint dabei unabhängig von weiteren Adapterproteinen abzulaufen. Diese neuen Erkenntnisse über die Signalwirkung gelöster TNF-Rezeptoren und des membranansässigen TNF scheinen anzudeuten, dass sTNF-R1 eine wichtige Rolle in der anti-inflammatorischen Regulierung auf der Ebene der Bestandkontrolle der Zellen des Immunsystems einnehmen könnte [79].



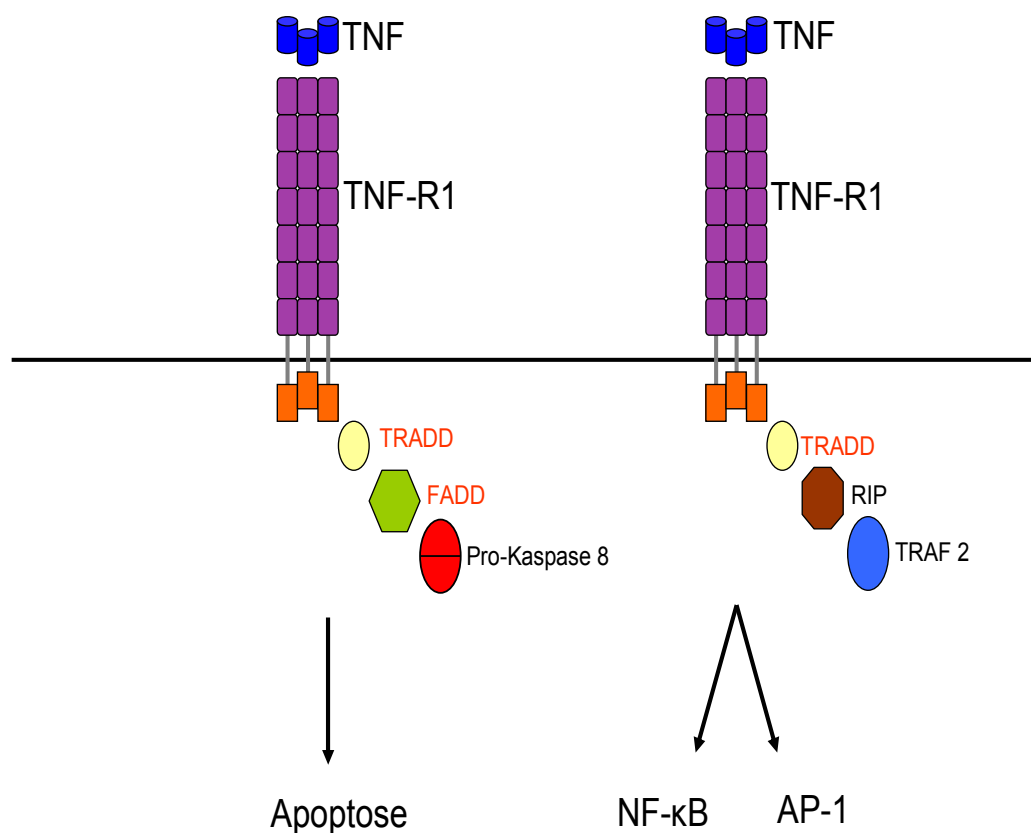
**Abbildung 1.4 : Die Signalwege des TNFα**

Das Zytokin TNFα kann sowohl in membrangebundener (memTNF) als auch –gelöster (sTNF) Form mit den beiden Rezeptoren TNF-Rezeptor-1 und -2 interagieren und die intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Abbildung modifiziert nach Wajant et al., 2003.

### 1.2.3.1 Der TNF-R1-Weg

Der TNF-R1 ist in wesentlichen Anteilen für die meisten biologischen Funktionen des Zytokins TNF $\alpha$  verantwortlich [77]. Der erste Schritt in dieser TNF-Signalkaskade führt über die Bindung des TNF-Trimers an die extrazelluläre Bindestelle des TNF-R1 [80]. Hierdurch erfolgt die Freigabe der so genannten „silencer of death domains“ (SODD) aus einer ICD des Rezeptors [65]. Die so entstandene aggregierte TNF-R1 ICD wird daraufhin von dem Adapterprotein „TNF receptor-associated death domain“ (TRADD) erkannt [81]. Das angeregte TRADD rekrutiert nun weitere Adapterproteine, das „receptor-interacting protein“ (RIP), „TNF-R-associated factor 2“ (TRAF2) oder das „Fas-associated death domain“ (FADD) protein [77]. Diese Proteine regen daraufhin Schlüsselenzyme des TNF-R1 an, welche letztendlich für den Beginn des Signalgeschehens zuständig sind [65]. Hierbei liegt TRADD an der Bifurkation zwischen den zwei Signalwegen des TNF $\alpha$ , dem apoptotischen Weg auf der einen und dem proinflammatorischen Weg auf der anderen Seite [76]. So kann über die Anregung des Adapterproteins FADD das proteolytische Enzym Kaspase 8 aktiviert werden, welches daraufhin vermutlich durch Selbstabspaltung eine Proteasen-Kaskade einleitet, die letztendlich zur Apoptose führt [82]. Im direkten Kontrast hierzu kann TNF $\alpha$  über die Aktivierung des TNF-R1 und somit auch von TRADD auch als ein antiapoptotischer Faktor wirksam sein [83]. TRADD kann hierbei über die Aktivierung von TRAF-2 das RIP rekrutieren. RIP aktiviert daraufhin die „Inhibitor of  $\kappa$ B Proteins“ (I $\kappa$ B $\alpha$ )-Kinase (IKK), welche zu einer Phosphorylierung und Ubiquitierung und somit auch zu einem Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$  führt. Dies führt schließlich zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B, die zu einer Induktion der Genexpression verschiedener Gene führt. Diese sind nun in der Lage die TNF-induzierte Apoptose zu unterdrücken [65;75]. Der Signalweg über die Anregung des Adapterproteins TRAF2 führt auch zu einer Aktivierung der Inhibitorproteine „cellular inhibitor of apoptosis protein-1“ (cIAP-1) und „cellular inhibitor of apoptosis protein-2“ (cIAP-2) [83]. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass unter anderem diese beiden Proteine über antiapoptotische Eigenschaften verfügen [84]. Zudem scheint TRAF-2 auch noch weitere Proteinkinasen, wie unter anderem die „mitogen-activated protein kinase kinase kinase“ (MAPKKK), die „extracellular signal-regulated kinase kinase1“ (MEKK1) oder die „apoptosis-stimulated kinase1“ (ASK1) zu aktivieren. Durch die Aktivierung dieser in der Nähe des Rezeptors gelegenen, unter anderem auch als Enzymkomplex erscheinenden Proteine, wird eine Reaktionskaskade angeregt, welche schließlich zu einer Aktivierung der „c-Jun NH2-terminal kinase“ (JNK) führt. Dieses Enzym ist letztendlich in der Lage die JKN zu phosphorylieren und seine Transkriptionsaktivität damit noch zusätzlich zu erhöhen [83].

Zusammenfassend kann somit geschlossen werden, dass TRADD und RIP eine besondere Rolle als die Schlüsselenzyme im Wendepunkt zwischen Zellproliferation und Zelltod im TNF-R1 Signalweg zu haben scheinen. Desweiteren scheint TRAF2 ein guter Indikator für die TNF $\alpha$ -bedingte Zellproliferation zu sein [83].



**Abbildung 1.5 : Die Signalkaskade des TNF-Rezeptor-1**

Nach Interaktion des TNF-Rezeptors-1 mit dem Zytokin TNF $\alpha$  kann einerseits ein pro-entzündlicher Weg über die Adapterproteine RIP und TRAF2 oder über das Adapterprotein FADD ein pro-apoptotischer Signalweg beschritten werden. Das direkt dem Rezeptor angegliederte Adapterprotein TRADD wirkt dabei als Bifurkationstelle zwischen den beiden gegensätzlichen Signalwegen. Abbildung modifiziert nach Hehlhans and Pfeffer, 2005.

### 1.2.3.2 Der TNF-R2-Weg

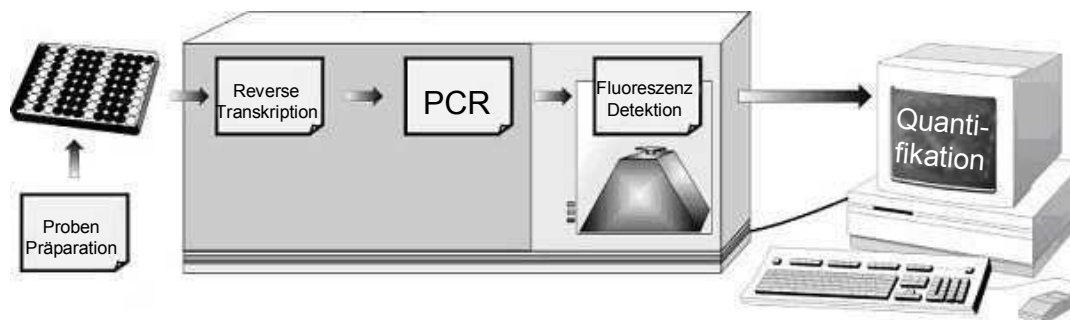
Wie bereits aufgeführt verfügt der zytoplasmatische Anteil des TNF-R2 im Gegensatz zu dem TNF-R1 nicht über die sogenannte Todesdomäne. Die Signalweiterleitung nach Bindung des TNF-R2 erfolgt somit direkt über die Aktivierung des TRAF-2 [85]. Dieses Adapterprotein kann wiederum sowohl über die Rekrutierung von NF- $\kappa$ B als auch über Aktivierung von JNK einen antiapoptotischen Signalweg bewirken [86;87]. Über die Aktivierung der JNK kann hierbei noch ein weiteres Protein AP-1 aktiviert werden, welches ebenfalls in der Lage ist, als Transkriptionsfaktor die Signalwege der Genexpression antiapoptotisch wirkender Gene zu beeinflussen [75]. Des weiteren konnte anhand von Studien belegt werden, dass neben NF- $\kappa$ B und JNK auch weitere Adapterproteine mit Enzymaktivität, wie zum Beispiel die Proteinkinasen p38 MAPK und p42/44 MAPK über die Signalwege des TNF-R2 aktiviert werden können [88]. Somit scheint der zweite der beiden TNF-Rezeptoren vor allem an der antiapoptotischen und proentzündlichen Wirkweise des Zytokins beteiligt zu sein [89]. Jedoch scheint der zweite der beiden TNF-Rezeptoren ebenfalls einen durch das Zytokin TNF- $\alpha$  induzierten Zelltod einzuleiten zu können [83]. Da wie schon angesprochen, dieser Rezeptor keine DD in seinem zytoplasmatischen Aufbau aufweist, kann die Apoptose auch nicht direkt über eine Signalkaskade der Adapterproteine TRADD-FADD induziert werden. Vielmehr scheinen die Signalwege, welche durch die Anregung des TNF-R2 in einem induzierten Zelltod resultieren viel komplexer und noch nicht komplett verstanden [75]. Jedoch konnten bereits einige Erkenntnisse auf diesem speziellen Gebiet erlangt werden [75]. Demnach scheint der TNF-R2 in einem engen Kommunikationsverhältnis mit dem TNF-R1 zu stehen. Zudem konnte dargestellt werden, dass die Stimulation des TNF-R2 zu einem Anstieg der TNF-R1-abhängigen Aktivierung des Apoptose-Enzyms Kaspase 8 führt [90;91]. Hierbei scheint der über die Wechselwirkungen der beiden Rezeptoren eingeleitete induzierte Zelltod in zwei eng miteinander verknüpften Mechanismen begründet zu sein. Zum einen scheinen beide Rezeptoren um die Bindung mit dem Adapterprotein TRAF-2 und seinen assoziierten antiapoptotischen Proteinen cIAP1 und cIAP2 zu konkurrieren. Desweiteren verstärkt die cIAP1-initiierte TRAF-2-Degradation noch zusätzlich die Konkurrenz der beiden Rezeptoren um die übrigen TRAF2, cIAP1 und cIAP2-Moleküle. Deshalb könnte die sonst innerhalb des TNF-R1-Signalkomplexes antiapoptotische Wirkung des cIAP1 durch die Rekrutierung innerhalb des TNF-R2-Kontextes in eine proapoptotische Funktion umgewandelt werden [73]. So scheint hierbei ein homotrimeres TNF-Zytokin an einen homotrimeren Rezeptor zu binden um somit die Signalwirkung zu triggern [92]. Zudem konnte bereits in mehreren Studien dargestellt werden, dass der TNF-R2 auch mit vielen

weiteren Rezeptoren, welche auch mit anderen Liganden interagieren, kommuniziert. So scheint der TNF-R2 unter anderem mit dem „receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand“ (RANKL) in Verbindung zu stehen, einem Rezeptor welcher ebenfalls zu der TNF-Zytokin-Superfamilie gerechnet wird [93;94].

### **1.3 Die Real-time Reverse-Transkriptase PCR**

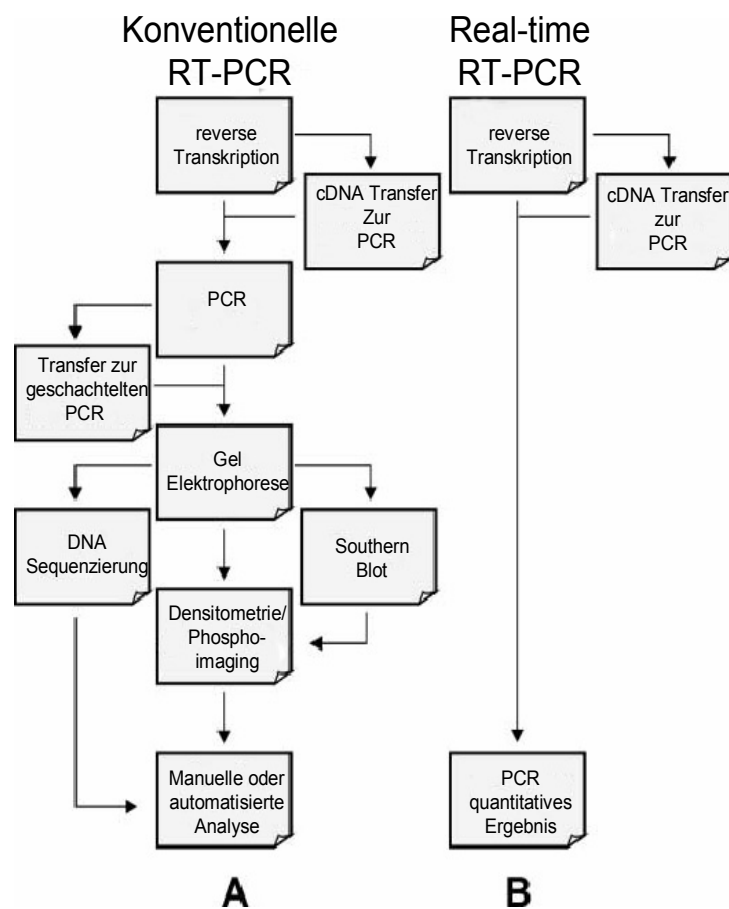
Wie schon erwähnt sind Zytokine an einer großen Zahl zellulärer Vorgänge beteiligt. Veränderungen in Hinblick auf Art und Weise oder Ausmaß der Genexpression der für diese Moleküle kodierenden Gene können an immunvermittelten Erkrankungen wie etwa der MS beteiligt sein [95]. Somit ist es von großer Bedeutung die beteiligten Zytokine und die mit ihnen assoziierten Faktoren zu detektieren und anschließend zu quantifizieren, um die immunologischen und pathologischen Signalwege dieser Erkrankung näher zu beleuchten [95;96]. Denn es scheint außerordentlich bedeutsam, die jeweiligen Zytokinprofile aufzuklären um den nötigen Einblick in die beteiligten Immunprozesse zu erlangen [97]. Da die zu analysierenden Gewebeproben häufig zu klein ausfallen, um die Untersuchung der Zytokine auf der Ebene der Proteine zu erlauben, sind Methoden weit verbreitet, welche auf der Ebene der mRNA eine Analyse der Moleküle ermöglichen, um Erkenntnisse über das Immungeschehen und die inflammatorischen Mechanismen zu gewinnen [96]. Heutzutage können eine Vielzahl an Untersuchungsmethoden angewendet werden um die mRNA-Expression der jeweiligen Zytokine zu quantifizieren. Hierbei wird jedoch die neue Methode der quantitativen Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) als die Methode der Wahl angesehen [98]. Da RT-PCR wohl die sensitivste und genaueste Methode der mRNA-Quantifizierung darstellt, kann hierbei auch die Genexpression der Zytokin-mRNA, welche häufig nur auf einem sehr niedrigen Niveau stattfindet, hinreichend untersucht werden [99]. Seit der Entwicklung der PCR wurde eine Vielzahl an Variationen dieser Methode etabliert um quantitative Ergebnisse zu erzielen. So wurde neben der semiquantitativen und quantitativen kompetitiven RT-PCR als Innovation die quantitative „real-time“ RT-PCR (Real-time RT-PCR) Technik entwickelt [96]. Das Prinzip dieser Methodik erlaubt in seiner praktischen Umsetzung eine direkte Messung der PCR-Produkt-Akkumulation während der exponentiellen Phase der Reaktion. Somit fasst diese Untersuchungsmethode die Amplifikation, die Detektion und die Quantifikation des Produktes in einem einzigen Schritt zusammen [95]. Die Vorgehensweise dieser neuen Methode beruht dabei auf der Fluoreszenz-Kinetik der PCR, welche ermöglicht, dass das

PCR-Produkt in Echtzeit (engl.: real-time) detektiert und quantifiziert wird. Diese Informationen können dabei im annähernd selben Zeitraum des Amplifikationsprozesses dargeboten werden. Somit wird eine anschließende Bearbeitung des PCR-Produktes oder der Ergebnisse nach Beendigung der Kettenreaktion nicht mehr benötigt [96]. Diese Technik erlaubt somit eine schnellere und somit korrektere Messtechnik im Vergleich zu der herkömmlichen Endpunkt- Analyse der konservativen PCR-Methoden [95;96]. Seit der erstmaligen Beschreibung dieser PCR-Technik vor 15 Jahren wurden eine Vielzahl verschiedener Echtzeit-Methoden und Real-time-PCR-Systeme mit einem immer größer werdenden Angebot an unterschiedlicher Instrumentation und verschiedenen Reaktionslösungen entwickelt [96;100]. Die in dieser Dissertationsarbeit angewendete Real-time RT-PCR-Methode wird in dem folgenden Abschnitt „Material und Methoden“ ausführlich aufgeführt und erläutert.



**Abbildung 1.6: Methode der quantitativen RT-PCR**

*Abbildung modifiziert nach Bustin, 2006.*



**Abbildungen 1.7: Methode der quantitativen Real-Time RT-PCR im Vergleich zu der konservativen PCR-Methode**

**A** stellt die konservative PCR- Methode mit Zwischenschritten dar

**B** stellt die Methode der quantitativen real-time-PCR dar

Abbildungen modifiziert nach Bustin, 2006.

#### **1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit**

Im Rahmen einer Grundlagen orientierten Arbeit mit einem explorativen Design sollte anhand einer in Echtzeit gesteuerten RT-PCR, die Genexpression der Proteine TRADD und FADD in humanen Blutleukozyten von MS-Erkrankten sowie gesunden Probanden im Sinne einer quantitativen Analyse untersucht werden. Hierbei wurde die Korrelation der gemessenen Parameter TRADD und FADD in Abhängigkeit von verschiedenen klinischen Variablen untersucht und somit auch die Frage, ob eine Bedeutung in der Pathogenese der MS bei den genannten Proteinen vorliegt, beleuchtet. In einer Parallelarbeit wurden zudem zwei weitere, in der TNF-Rezeptor-Signal-Kaskade integrierte Adapterproteine, RIP und TRAF-2 untersucht. Das Ziel war es, hierdurch neue Erkenntnisse über die Signaltransduktion der beiden TNF-Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 samt ihrer Adapterproteine und damit über ihre nach wie vor wenig untersuchte Funktion in der Immunogenese der MS und ihrer verschiedenen Verlaufsformen, zu erlangen. Die Ergebnisse könnten damit auch die Grundlage für die Frage eines therapeutischen Nutzens der genannten Proteine bei der MS bilden.

Hierzu wurden im ersten Schritt der Arbeit die Methoden der Real-time RT-PCR für die beiden Proteine in mehreren Schritten etabliert und optimiert.

Im einem weiteren Schritt wurden die neu etablierten PCR angewendet, um anhand eines ausgesuchten Kollektivs, bestehend aus 54 MS-Patienten, welche drei verschiedenen Gruppen der MS-Verlaufsformen zugeordnet wurden ( 12 Patienten mit PP-MS, 23 Patienten mit RR-MS sowie 19 Patienten mit SP-MS) und 29 gesunden Probanden, die Expression der beiden an der Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren beteiligten Adapterproteine TRADD und FADD in den verschiedenen Gruppen zu untersuchen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör

<i>Geräte bzw. Zubehör</i>	<i>Hersteller</i>
Expressionsanalyse:	
Küvette Typ 105.204-QS	Hellma, Mühlheim
Light Cycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler Zentrifugenadapter	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Minishaker „MS1“	IKA-Labortechnik, Staufen
PC-System, Printer	Hewlett Peckard, Wien, Österreich
PH-Meter „CG820“	Schott-Geräte GmbH, Hofheim
Photometer „Ultrospec 2000“	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Pipettierhilfe „Pipettboy acu“	Integra Biosciences
Sterilbank Laminar Flow	Beer, Germering
Thermocycler „PCR Sprint“	Hybaid, Heidelberg
Zentrifuge „Biofuge 13“	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge „Universal 32 R“	Hettich, Tuttlingen

#### 2.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Enzyme:

Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SuperScript™ II	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
RNase H-Reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
RNase H	Qiagen, Hilden
Recombinant RNasin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim

Reaktionskits:

RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin®Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR-Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 2.1.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Rnase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RLT-buffer (Zelllyse-Puffer)	Qiagen, Hilden
Primer	TIB-Molbiol, Berlin
Plasmidstandard	GenExpress, Berlin
PCR®2.1 Vektor	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Oligo-dT 12-18 (20mM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MS2-RNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Montage™PCR Centrifugal Filter Devices	Millipore, Eschborn
Hybridisation Probes	TIB-Molbiol, Berlin
First strand buffer (RT- Puffer)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethanol (100%)	Merck, Darmstadt
Erythrocytes lysis buffer (EL-Puffer)	Qiagen, Hilden
DTT	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
dNTP	Eurogentec, Köln
Aqua ad injectabilia	Baxter, Lessines, Belgien
B-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
TBE-Puffer	Invitrogen Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Agarose-Probenpuffer	SEVRA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose	SEVRA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
DMSO	Roth, Karlsruhe

### 2.1.4 Sonstige Materialien

Für die Verarbeitung der Blutproben wurden sterile, pyrogenfreie Plastikmaterialien der Firma Kabe Labortechnik, Nümbrech-Elsenroth, sowie Greiner, Frickenhausen, und BD Biosciences, Heidelberg verwendet. Zusätzlich wurden für die Arbeit spezielle Plastikmaterialien zur einmaligen Verwendung von den Firmen Biozym, Hessisch –Oldendorf und Greiner, Frickenhausen bezogen.

### 2.1.5 Software und Hilfsprogramme

Lightcycler3 Data Analysis 3.5.28	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler3 Run 5.10	Roche Diagnostics, Mannheim
Primer-Design	TIB-Molbiol, Berlin
Hybridisierungssonden-Design	TIB-Molbiol, Berlin
Excel	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim

### 2.1.6 Datenbanken

Genome Database	Genbank: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/</a>
-----------------	--

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Arbeitsweisen und – bedingungen

Die Untersuchung der interessanten Adapterproteine erfolgte an asserviertem Restblut, welches aus diagnostischen Routine-Blutentnahmen im Rahmen der MS-Sprechstunde der Neurologischen Klinik in Giessen stammte. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Gießen lag vor (AZ 08/06). Die Asservierung und Weiterverwendung des Restblutes erfolgte nach vorheriger Aufklärung der Patienten und ihrem schriftlichen Einverständnis hierzu. Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden freiwilligen Erwachsenen, deren schriftliche Einverständniserklärung ebenfalls vorlag. Während der Etablierungsphase der PCR wurde nach ausführlicher Aufklärung und vorliegendem schriftlichen Einverständnis das Blut freiwilliger Probanden zur cDNA-Herstellung verwendet.

Neben den üblichen Laborstandards waren während der Etablierung und Prüfung der PCR weitere Arbeitsmethoden nötig um experimentelle Artefakte und insbesondere Kontaminationen zu vermeiden.

Deshalb wurde zur Flächendesinfektion zu den gebräuchlichen Alkoholmischungen eine spezielle Lösung zur RNA- und DNA-Beseitigung verwendet. Zusätzlich wurden die einzelnen Arbeitsgeräte in regelmäßigen Zeitabständen chemisch und mechanisch gesäubert. Zudem wurden die Handschuhe konsequent zwischen den einzelnen Arbeitsschritten gewechselt, besondere Sorgfalt galt dabei vor allem bei den Arbeitsabläufen zwischen RNA- und cDNA-Verarbeitung. Um unnötige Verunreinigungen zu vermeiden, wurden Pipetten und sonstige Materialien strikt nach RNA- und cDNA-Gebrauch getrennt. Die verwendeten Reagenzien wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und verarbeitet. Dabei wurden nur sterile Lösungen und autoklavierte Verbrauchsmaterialien, sowie ausschließlich gestopfte Einmal-Filterspitzen verwendet. Durch Verwendung von aliquotierten, gebrauchsfertigen Mengen konnte ein unnötiges wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren, und somit eine eventuelle Qualitätsminderung der Reagenzien vermieden werden. Die Ansätze zur cDNA-Synthese und PCR-Amplifizierung wurden konsequent unter dem Laminar-Flow der Klasse 1 hergestellt. Die Arbeitsgänge der PCR-Vorbereitung waren stets strikt räumlich von der PCR selbst getrennt.

Für die PCR-Ansätze wurden H<sub>2</sub>O-Aliquots der Reaktionskits oder separates RNase-freies Wasser verwendet. Reagenzien welche ungelöst als Lyophilisat vorlagen wurden dunkel bei 4°C gelagert. Alle weiteren bereits gelösten Materialien wurden bei -20°C oder -80°C gelagert. Während der Arbeitsschritte wurden die jeweiligen Lösungen und Proben stets auf Eis gekühlt. Um zu frühe Reaktionen zu vermeiden wurden Enzyme den Mixturen zuletzt zugefügt.

## **2.2.2 RNA-Isolation und Reverse Transkription**

### **2.2.2.1 Leukozytenisolation**

Das benötigte Blut wurde in EDTA-Röhrchen entnommen und daraufhin sofort weiterverwendet. Aus dem unkoagulierten Blut wurden in den folgenden Arbeitsschritten die Leukozyten abgetrennt, die Leukozyten-RNA isoliert und diese in der reversen Transkriptionsreaktion zu cDNA synthetisiert. Unter Verwendung der so erhaltenen DNA konnte die Methode der Real-Time PCR für die TNF-Rezeptor- assoziierten Proteine etabliert werden. Nach Abschluss der Etablierung wurde die neu erworbene Methode am ausgewählten

Patienten-Kollektiv verwendet. Dafür musste ebenfalls durch die bereits beschriebenen Arbeitsschritte cDNA aus dem Patientenblut synthetisiert werden.

Zur Leukozytenisolierung wurde unmittelbar nach der Blutentnahme jeweils 1,5ml EDTA-Blut mit 7,5ml Erythrozyten-Lysis-Puffer (EL-buffer) versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. In diesem Arbeitsschritt wurden die Erythrozyten selektiv lysiert. Die erfolgreiche Lyse wurde durch eine Farbveränderung der Lösung angezeigt. Daraufhin folgte eine komplette Entfernung der Erythrozyten und die Selektion der benötigten Leukozyten. Dazu wurden die Leukozyten mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 1600rpm und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgte ein weiterer Waschgang mit 3ml EL-buffer. Hierbei wurde die Lösung mit dem Puffer vermischt und anschließend gevortext um eventuell mitsedimentierte Erythrozyten komplett zu entfernen. Es folgte eine weitere zehnmünütige Zentrifugation bei gleichen Konditionen. Der Überstand wurde nun vorsichtig entfernt und das am Boden haftende Leukozytenpellet mit 600µl RLT-Puffer resuspendiert. Dadurch wurden die Zellen ebenfalls lysiert und chaotrope Salze, welche für die Bindung der RNA benötigt wurden, eingebracht. Um die so freigesetzte RNA vor dem Abbau durch RNasen zu schützen wurde der Puffer zuvor mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Dies erzielte eine Inhibition der Enzyme durch Reduzierung der Disulfid-Brücken. Die so entstandenen Leukozytenlysate konnten nun bei -80°C gelagert oder direkt weiter bearbeitet werden.

#### **2.2.2.2 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des QIAamp®RNA Blood Mini Kits dem Protokoll des Herstellers entsprechend. Dabei wurde das Lysat zunächst durch Zentrifugation (2 Min, 14.000rpm) in der speziellen QIAshredder-Säule homogenisiert. Es folgten dann 2 Waschgänge des Lysats mit 600µl 70%-igem Ethanol, wobei im Rahmen der Zentrifugation (15 Sekunden bei 10.000rpm) die im Lysat vorhandene RNA an der Silica-Membran der QIAamp Säule gebunden wurde. Die gebundene RNA wurde anschließend erneut durch Auftragen von 350µl RW1-Puffer und Zentrifugation (15 Sekunden, 10.000rpm) gereinigt. Um selbst geringfügige DNA-Kontaminationen zu vermeiden wurde im Anschluss ein DNA-Verdau mittels des RNase free DNase Set durchgeführt. Dabei wurden 80µl einer DNase-RDD-Pufferlösung auf die Säulenmembran pipettiert und die Säulen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch drei weitere Waschschrte, zunächst mit 350µl RW1-Puffer und anschließend zweimal mit 500µl RPE-Puffer wurden die DNA-Reste entfernt. Schließlich wurde die gereinigte RNA von der Säule durch einen weiteren

Zentrifugationsgang (1 Minute bei 10.000rpm) in 50µl RNase-freies Wasser eluiert. Die isolierte RNA konnte nun für die cDNA-Synthese direkt weiterverwendet, oder aber auch in gefrorenem Zustand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.2.2.3 cDNA-Synthese

Während der sich anschließenden cDNA-Synthese wurde die so erhaltene Leukozyten-mRNA unter Verwendung des Enzyms Reverse Transcriptase (SuperScript Rtase) in Einzelstrang cDNA umgeschrieben. In der reversen Transkriptionsreaktion wurden jeweils 9,5µl RNA (ca. 0,2-1,5µg) in einem Endvolumen von 20µl unter Verwendung eines klassischen PCR-Thermalcyclers umgeschrieben. Dabei wurde die Leukozyten-mRNA zunächst mit je 1µl Oligo-dT 12-18 Primer (0,1µg/µl) in ultradünnen PCR-tubes versetzt, gemischt und für 10Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  im Thermalcycler "PCRsprint" inkubiert. Durch diesen Schritt konnten eventuell vorhandene Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst werden. Anschließend wurden die Ansätze sofort auf Eis gekühlt, um die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen. Die Primer, bestehend aus Oligo-Nukleotiden mit 12-18 Thymidinen banden dabei an den Poly A-Schwanz der Leukozyten-RNA. Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Mastermix, gemischt aus jeweils 4µl 5x First strand buffer (Reaktionspuffer), 2µl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M), 2µl dNTPs (je 5mM), 0,5µl RNase Inhibitor(20U/µl) und 1µl SuperScript® II (M-MLV) RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (200U/µl) hergestellt. Die M-MLV Reverse Transkriptase ist bei der Umsetzung sehr langer RNA-Matrizen, von bis zu 20.000 Basen erforderlich. Dieses Enzym besitzt, wenn auch nur in geringem Umfang, eine RNase-Aktivität. Dadurch können während der Erststrangsynthese Einzelstrangbrüche in der mRNA entstehen. Dies hätte die Effizienz der RT-PCR noch zusätzlich weiter senken können. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wurde dem Mastermix ein RNase -Inhibitor zugesetzt.

Die Volumenmenge konnte der RNA-Primerlösung jeweils angeglichen werden. Die Ansätze wurden im Anschluss durch Zentrifugation (20 Sekunden, 3000rpm,  $10^{\circ}\text{C}$ ) vermischt. Die eigentliche cDNA-Synthese wurde dann nach einem festen Protokoll im Thermalcycler durchgeführt. Zu Beginn wurden die Ansätze 10 Minuten bei  $35^{\circ}\text{C}$  inkubiert, dieser Schritt wurde für das Anlagern des Primers an den PolyA-Schwanz der RNA benötigt. Die reverse Transkription schloss sich im weiteren Schritt für 60 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  an. Dem folgten 5 Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$ , um gegebenenfalls vorhandene RTasen zu inaktivieren und um Einzelstränge zu erhalten. Eine schnelle Kühlphase bei  $4^{\circ}\text{C}$  beendete zum Schluss die

Reaktion. Die so entstandene cDNA wurde hierauf in silikonisierte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.3 Messung der Genexpression mittels quantitativer Real-time PCR**

#### **2.2.3.1 Methodik der quantitativen Real-time RT-PCR**

Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist wohl die sensitivste Möglichkeit um niedrig exprimierte mRNA in Zellen nachzuweisen [98]. Dabei ermöglicht die Real-time-RT-PCR Methodik die Darstellung der Produktakkumulation in Echtzeit. Durch die Detektion fluoreszierender Farbstoffe, welche der DNA angelagert werden, kann die Amplifikation veranschaulicht werden. Dabei wird die Reaktion vor allem durch den Zeitpunkt während des gesamten Reaktionsablaufs gekennzeichnet, an welchem die Fluoreszenz und damit auch die Menge an amplifizierter cDNA, einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Zeitpunkt wird als „Crossing Point“ (Cp) bezeichnet oder auch indirekt als „Threshold Cycle“ (Ct) angegeben. Letzterer repräsentiert also in etwa den Zyklus, an welchem die Fluoreszenz diesen Schwellenwert signifikant überschreitet. Durch die Ermittlung dieses Wertes kann schließlich durch das verwendete LightCycler-System automatisch die Startkopienmenge am Anfang der PCR-Reaktion ermittelt werden. Der Ct wird dabei umso eher erreicht, je mehr Template zu Beginn der Amplifikation vorliegen. Somit war der Ct die zu ermittelnde Größe, um die Genexpression der TNF-Rezeptor-assoziierten Proteine TRADD und FADD zu untersuchen.

#### **2.2.3.2 Quantifizierungsprinzipien**

Für die Untersuchung wurde die Kombination zweier Quantifizierungsprinzipien, der relativen sowie der absoluten Quantifizierung gewählt. Bei der absoluten Quantifizierungsmethode wurden die PCR-Produkt-Konzentrationen als Absolutwerte (Kopienanzahl/ $\mu\text{g}$  mRNA) anhand eines externen Plasmidstandards mit bekannter Konzentration ermittelt. Jedoch konnte so nur die Menge an cDNA im Reaktionsansatz dargestellt werden. Da die cDNA-Synthese jedoch teilweise mit unterschiedlicher Effizienz abläuft, gab diese Quantifizierungsmethode nur Hinweise auf die Menge der mRNA, aber keinen Absolutwert. Rückschlüsse auf die exakte mRNA-Menge im Ausgangsmaterial konnten so nicht gezogen werden. Deshalb wurde zusätzlich dazu die relative Quantifizierungsmethode verwendet. Hierbei wurde die zu bestimmende Expression des

Zielgens in Relation zu einer internen Kontrolle, dem endogenen Haushaltsgen (engl. „housekeeping gene“) Porphobilinogendesaminase (PBGD) gesetzt. PBGD wird konstitutiv auf einem ähnlichen Level in den jeweiligen Zelltypen exprimiert und es sind keine weiteren Pseudogene bekannt [95]. Durch den Vergleich mit dem Haushaltsgen als internem Standard konnten so beeinflussende Faktoren, wie etwa Modifikationen der anfänglichen RNA-Menge und -Qualität oder eine mögliche RNA-Degradation, korrigiert werden. Auch die bereits erwähnten Differenzen in der cDNA-Synthese, aber auch eventuell vorhandene Inhibitoren und Pipettierfehler konnten so beglichen werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass ein interner Standard auch keiner Konstante entspricht und in bestimmtem Maße auch eine Veränderung in der Expression erfährt.

### **2.2.3.3 Das LightCycler System**

Für die Amplifikation wurde das LightCycler-System der Firma Roche verwendet, eine Thermocycler-Plattform welche für die Online-Quantifizierung von Amplifikationsprodukten in Echtzeit ausgelegt ist. Der Cycler besteht aus einer Temperatur-Zyklus-Komponente und einem Online-Fluoreszenz-Detektor. Des Weiteren war er mit einem PC verbunden, welcher über die entsprechende Software zur Datenbearbeitung verfügte. Die Temperaturregulation im Cycler wurde über die Luftzufuhr geregelt. Durch Einsatz von Glaskapillaren wurde zudem ein schneller Temperaturtransfer in den Reaktionsansätzen gewährleistet. Die PCR fand dabei in den mit der Ansatzlösung befüllten Glaskapillaren statt. Diese wurden in ein Karussell eingespannt, in den Cycler eingesetzt und dienten zudem auch als Küvetten bei der direkten Fluoreszenz-Reaktionsmessung. Pro PCR-Lauf konnten so bis zu 32 Proben gleichzeitig gemessen werden. Das Karussell wurde bei der Messung kontinuierlich gedreht und die einzelnen Kapillaren jeweils nacheinander über die Detektionseinheit gefahren. So konnte die Intensität der Fluoreszenz bei jedem PCR-Zyklus und in allen Proben nahezu gleichzeitig erfasst werden. Die speziell für dieses System verwendeten Fluorophore wurden durch eine LED, mit der Wellenlänge von 470nm angeregt. Die, von den Proben ausgestrahlte Fluoreszenz, wurde dann gesammelt über drei unterschiedliche Photozellen geleitet, welche jeweils in einem bestimmten Wellenlängenbereich detektierten. Damit wurde eine Fluoreszenzmessung über drei Kanäle, F1 530 +/- 20nm, F2 640 +/- 30nm und F3 710 +/- 40nm möglich. Anschließend wurden die Daten mittels der speziellen Software verarbeitet und am Bildschirm als PCR-Kurven angezeigt. Die Amplifikation konnte dadurch in jeder Phase dargestellt und während des Laufs verfolgt werden.



#### **2.2.3.4 Die Herstellung der Oligonukleotide**

Die Wahl von Primer und Sonden hatte eine überaus große Bedeutung für die Sensitivität und Spezifität und letztendlich die Ergebnisse der PCR. Die verwendeten Oligonukleotide wurden deshalb speziell für die gewünschten Amplifikationen maßgeschneidert. Die Hybridisierungssonden und Primer wurden durch die Firma TIB Molbiol, Berlin nach ausgewählten Vorgaben entwickelt und synthetisiert. Die endgültige Auswahl wurde während der Etablierungsphase getroffen. Die Primer wurden in entsalzter Form, die Sonden mehrfach gereinigt eingesetzt. Zudem wurden die Primer, um eine Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, intronübergreifend in verschiedenen Exons gewählt.

##### ***Primerdesign***

Um die entsprechenden Primersequenzen zu ermitteln und optimieren wurden die von der Firma TIB Molbiol, Berlin, entwickelten Oligonukleotide zusätzlich nach den folgenden Regeln geprüft. Die Sequenzen sollten eine Länge von 18-30 Basen beinhalten und dabei einen Guanin-Cytosin-Gehalt von 40-60% aufweisen. Um Fehlhybridisierungen zu vermeiden, sollten die Primer keine Sequenzen von mehr als vier aufeinander folgenden gleichen Basen besitzen. Zudem wurde auf eine ähnliche Schmelztemperatur beider Primer zwischen 55°C und 65°C geachtet. Dies gewährleistete eine homologe Bindung der Primer, sowie eine ausreichend hohe Annealingtemperatur. Weiterhin musste eine Komplementarität innerhalb der beiden Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer), aber auch gegenüber der cDNA ausgeschlossen werden. Dies hätte ansonsten zu Primer-Dimer-Bildung oder zu unspezifischen Produkten führen können. Das 3'-Ende der Primer sollte höchstens einmal Guanin oder Cytosin als Base aufweisen, um mögliche fehlhybridisierte Primer nicht zu stabilisieren. Um eine gute Bindungsfähigkeit an der cDNA zu ermöglichen, sollten die Primer keine signifikanten Sekundärstrukturen wie loops oder hair pins beinhalten. Aber auch die Amplifikationssequenz sollte keine solchen Strukturen aufweisen, um die Bindungsfähigkeit nicht zu behindern. Zuallerletzt sollte die von den Primern eingegrenzte cDNA-Sequenz nicht länger als 500bp sein, um das Detektionslimit der Sonden nicht zu erreichen.

##### ***Sondendesign***

Im Anschluss an die Auswahl der Primer wurden auch die geeigneten Hybridisierungssonden (Hyprobes) ausgewählt. Wie schon die Primer, wurden auch die Hyprobes von der Firma TIB

Molbiol, Berlin entwickelt und synthetisiert. Diese wurden zusätzlich zu den bereits erwähnten Auswahlkriterien auch nach den folgenden Regeln ausgewählt: Die Sonden sollten innerhalb der Zielsequenz nicht in unmittelbarer Nähe der Primer oder mit der Primersequenz überlappend binden. Ein solcher Sitz der Sonden hätte eine zu schnelle Ablösung von der Zielsequenz und damit die Hemmung der Reaktion zur Folge. Des Weiteren sollten die Hybridisierungs sonden eine höhere Schmelztemperatur als die Primer aufweisen, da sie während der Abkühlphase durch die Doppelstrangsynthese verdrängt werden [98]. Als Richtlinie wurde dabei eine 5°C über der Annealingtemperatur liegende Temperatur gewählt. Es sollte zudem darauf geachtet werden, dass die beiden Sonden dicht nebeneinander banden, damit sich die terminalen Fluorophore gegenüber standen. Um eine optimale Fluoreszenz zu erreichen sollten zwischen Donor und Akzeptor höchstens 3 Basen liegen. Schließlich sollte auch darauf geachtet werden, dass sich unter dieser kurzen Donor-Akzeptor Sequenz kein Guanin befand, da diese Base die Fluoreszenz absorbieren könnte [98].

Während der Etablierungsphase der Methode zeigte sich aber auch, dass nicht zu jeder Zeit alle Auswahlkriterien für Primer und Sonden eingehalten werden konnten. Letztendlich konnten die optimalen Systemkombinationen durch die praktische Anwendung gefunden werden.

Tab.1: verwendete Primer und Hyprobes:

Ziel-sequenz	Name	Sequenzen 5'-3'	Länge(b)	Position
TRADD	1.TRADD-FL	gAgACCCACAgAgCgCgCgA	20	757-738
	2.TRADD-LC	CgTCTgTTggTCCTTCAggCTCAgC	25	736-712
	3.TRADD-F	gggTCAgCCTgTAgTgAATCg	21	688-708
	4.TRADD-as	gTCCTCTgCCAggCTggTg	19	973-954
FADD	1.FADD-FL	TggCTCgTCAgCTCAAAGTCTCAgAC	26	641-666
	2.FADD-LC	CCAAGATCgACAgCATCgAggACAgA	26	668-693
	3.FADD-R	gTTgCgTTCTCCTTCTCTgTgTT	23	767-745
	4.FADD-S	gAAgAAgACCTgTgTgCAgCATT	23	577-599

(1. Donor-Sonde; 2. Akzeptor-Sonde; 3. Vorwärts-Primer; 4. Rückwärts-Primer)

Angaben basieren auf den Sequenzen der Genomischen Datenbank für TRADD und FADD

### **2.2.3.5 Die Herstellung der Plasmidstandards als externe Kontrolle**

Wie bereits erwähnt, mussten die Ergebnisse der Amplifizierung jeweils mit den Ergebnissen der Amplifizierung einer Kontrolle bekannter Menge verglichen werden, um Aussagen über die absolute cDNA-Menge im Reaktionsansatz treffen zu können. Als solche externen, homologen DNA-Standards wurden reine PCR-Produkte verwendet. Dabei war es wichtig, dass diese Kontrolle der cDNA-Sequenz glich, damit bei der Amplifikation zumindest von sehr ähnlicher Effizienz ausgegangen werden konnte. Dadurch konnte bei den späteren Kollektivmessungen eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Patientenproben mit den Standards gewährleistet werden. Die Plasmidkontrollen wurden von der Firma GenExpress, Berlin, in den Vektor pCR 2.1 der Firma Invitrogen kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Aliquots zu je  $10^{10}$  Kopien mussten anschließend in einer speziellen Verdünnungsreihe in die jeweiligen Konzentrationen von  $10^1$  bis  $10^{10}$  verdünnt werden. Mit diesen Konzentrationsabstufungen konnten letztendlich die Standardkurven erstellt werden, welche dann in die einzelnen Versuchsläufe eingebracht werden konnten. Somit konnten schließlich auch Aussagen bezüglich der cDNA-Mengen getroffen werden.

#### ***Verdünnungsreihen der externen Plasmid-Standards***

Zur Erstellung der Standardkurven wurden die Plasmidstandards mit RNA ( $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ ) der Bakteriophage MS2 von der Ausgangskonzentration von  $10^{10}$  Kopien in 10 Stufen verdünnt. Durch Verwendung der MS2-RNA wurde verhindert, dass sich die Plasmid-DNA an den Gefäßwänden niederschlug. Dafür wurden zunächst  $150\mu\text{l}$  MS2-RNA, welches  $1500\text{ ng}$  RNA entsprach, mit  $11850\mu\text{l}$  sterilem Wasser vermischt, um eine Verdünnung im Verhältnis 1:80 zu erhalten. Mit  $200\mu\text{l}$  dieser MS2 RNA-Wasser-Lösung wurden die erhaltenen Plasmid-Aliquots angesetzt. Die hergestellte Lösung beinhaltete somit  $10^{10}$  Kopien und konnte anschließend jeweils in 1:10-Schritten ( $150\mu\text{l}$  PlasmidLösung +  $1350\mu\text{l}$  MS2-RNA) oder 1:100-Schritten ( $15\mu\text{l}$  Plasmidlösung +  $1485\mu\text{l}$  MS2-RNA) abgestuft werden. In der dargestellten Weise wurden für die beiden Genprodukte TRADD und FADD Verdünnungsreihen der Konzentrationen  $10^{10}$  bis  $10^1$  hergestellt. Aus diesen, unterschiedlich

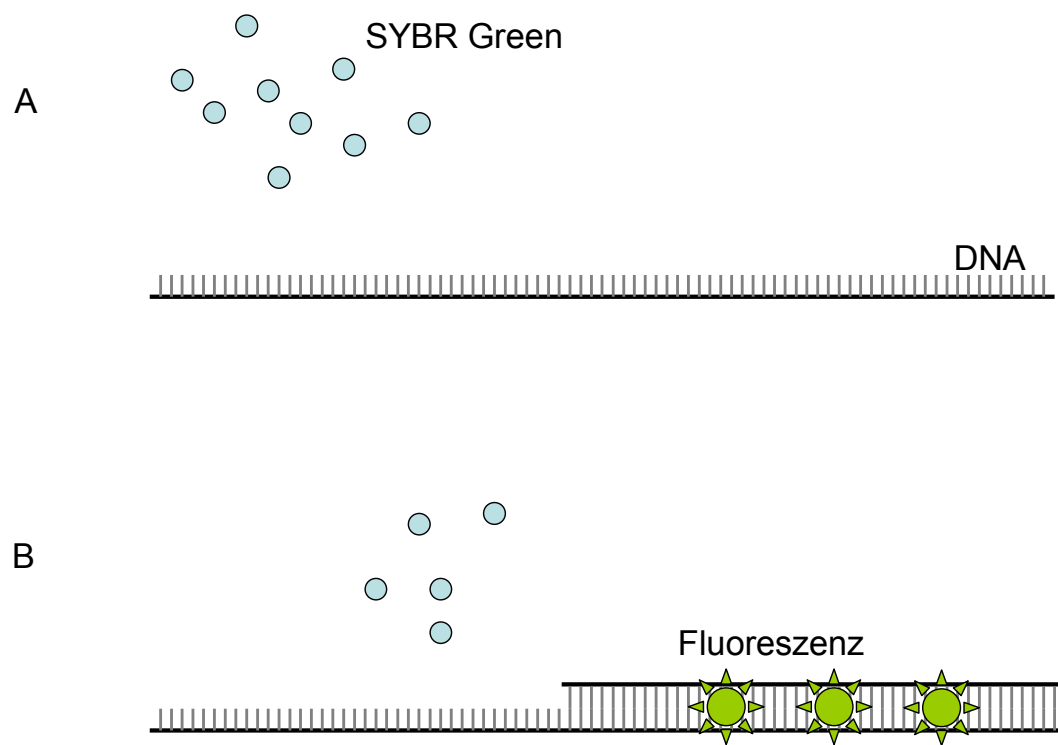
konzentrierten Plasmidlösungen wurde nun die passende, dem PCR-Produkt am nächsten gelegene Konzentration, für den externen Standard ermittelt.

#### **2.2.3.6 Fluoreszenzbasierte Detektionsformate**

Bei der Real-time-PCR Methode kann die Fluoreszenzmessung mit einer Vielzahl an Methoden durchgeführt werden. Unter anderem können dabei Techniken unterschieden werden, die bei Verwendung von Interkalatoren, wie z.B. Ethidiumbromid, produktunspezifisch, oder aber durch Verwendung spezieller Sonden die Fluoreszenz spezifisch erfassen können. Der Vorteil einer spezifischen Detektion zeigt sich in der Möglichkeit nur die spezielle, zu untersuchende Amplifikation darzustellen. Da die Sonden nur an bestimmten Stellen der cDNA binden können, führen „falsche“ Produkte wie z.B. Primer-Dimere nicht zu einer Fluoreszenz. Sie müssen deshalb auch speziell für eine bestimmte PCR-Reaktion unter Entwicklungs- und Kostenaufwand synthetisiert werden. Demgegenüber stellt die Verwendung von Interkalatoren die günstigere und universell einsetzbare Detektionsmöglichkeit dar. Während der Etablierungsarbeit wurden beide Messungsformen verwendet. Aus diesen Gründen wurde zu Beginn der Arbeit eine unspezifische Fluoreszenzmessung mit dem Interkalator SYBR-Green1 verwendet. Nach weiterem erfolgreichen Fortschreiten der Etablierung wurde dann zu dem spezifischen Verfahren mit Verwendung von Hyprobes gewechselt.

#### ***Die unspezifische Detektion mittels SYBR-Green1***

Das Prinzip der unspezifischen Detektion basiert auf der Interkalation von Fluoreszenzfarbstoffen in der DNA. In dieser Arbeit wurde dabei der Farbstoff SYBR-Green1 verwendet, welcher ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis als das schon erwähnte Ethidiumbromid liefert. Dieser Farbstoff lagert sich in der Doppelstrang-cDNA ein, wodurch es bei fortschreitender PCR-Reaktion zu einem messbaren Fluoreszenzanstieg kommt. Ein großer Vorteil dieses Farbstoffes ist, neben den universellen Einsatzmöglichkeiten in jeder beliebigen PCR-Reaktion, seine hohe Signalstärke. Jedes DNA-Molekül kann mehrere Fluoreszenzmoleküle binden und fluoresziert nach Anregung etwa 1000-mal stärker als der freie Farbstoff [96].



**Abbildung 2.1: Detektion mittels SYBR-Green1**

*A* Die in der Lösung freien Moleküle emittieren kein Floureszenzlicht

*B* Erst nach Bindung des SYBR-Green1-Farbstoffes an die DNA erfolgt die Emmision des Lichts

Abbildung modifiziert nach Giulietti et al., 2001

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt am Ende der Elongationsphase, wenn die größte Menge an doppelsträngiger cDNA vorliegt. Jedoch fehlt dabei, wie schon erwähnt, eine spezifische Bindung des Fluorophors an Doppelstrang-DNA. Damit ist eine Unterscheidung zwischen dem spezifischen Produkt und Artefakten oder Primer-Dimeren, welche ebenso einen Fluoreszenzanstieg bewirken können, nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Amplifikation mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse der Nachweis des spezifischen Produktes und die Differenzierung von Artefakten durchgeführt. Bei dieser Analyse kam es durch einen schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Denaturierung der cDNA-Doppelstränge entsprechend ihrem jeweiligen Schmelzpunkt. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wurde vom LightCycler-System aufgezeichnet und als Grafik angezeigt. Die individuelle Schmelztemperatur ( $T_m$ ) war von der Fragmentlänge, dem Cytosin-Guanin-Gehalt des Produktes, sowie dem Salzgehalt des verwendeten Puffers abhängig. Aufgrund dieser Individualität konnte zwischen Artefakten wie Primer-Dimeren und tatsächlichem PCR-Produkt unterschieden werden. Da die Artefakte eine viel kürzere Sequenzlänge als die gesuchte cDNA aufwiesen, fand eine Denaturierung der Dimere schon bei einer geringeren Temperatur statt.

Zusätzlich wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des spezifischen Produktes durchgeführt. Dadurch konnte bestätigt werden, dass durch die jeweilige PCR-Reaktion tatsächlich cDNA der korrekten, durch die Lage der Primer vorgegebene Sequenzlänge, amplifiziert wurde.

Sämtliche Etablierungsreaktionen mit SYBR-Green1 wurden unter Verwendung des „LightCycler-Fast-start DNA Master SYBR-Green1“-Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Master-Mix wurde hierbei ein gebrauchsfertiger „Hot Start“-Reaktionsmix mit Faststart-Taq-DNA-Polymerase verwendet. Das Wirkoptimum der Taq-DNA-Polymerase liegt bei 74°C, jedoch besteht bereits bei 25°C eine geringe Enzymaktivität. Aus diesem Grund wurde mit der Faststart-Taq-DNA-Polymerase eine modifizierte Form des Enzyms verwendet. Da das modifizierte Enzym bei Raumtemperatur in inaktivierter Form vorlag, konnte die Bildung unspezifischer Nebenprodukte zum großen Teil vermieden werden.

Für den Reaktionsmastermix wurden anschließend RNase-freies Wasser,  $MgCl_2$ , Vorwärts- sowie Rückwärtsprimer und die Faststart-DNA-Polymerase auf Eis gemischt und anschließend in vorgekühlte Glaskapillaren pipetiert. Während der Etablierung und Optimierung der PCR-Reaktion wurden die eingesetzten Konzentrationen des  $MgCl_2$  verändert. Um die Ergebnisse bei der Amplifikation des TRADD-Genoms noch zu verbessern

und die Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern, musste dem Mastermix noch zusätzlich Dimethylsulfoxid (DMSO) zugeführt werden. Dieses Reagenz wirkt als Lösungsmittel und verbessert die Effizienz der Amplifikation. Alle Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20µl pro Kapillare (18µl Mastermix und 2µl Probenvolumen) und nach dem entwickelten Protokoll durchgeführt. Während der Entwicklung der PCR mittels SYBR-Green1 wurden jeweils 2µl Probanden-DNA als Probe verwendet. Zusätzlich wurden noch jeweils 2µl DNA als Positivkontrolle, 2µl RNA als PCR-Negativkontrolle sowie 2µl steriles Wasser als Negativkontrolle mitgeführt. Nach vorsichtigem Verschließen der Kapillaren wurden diese für 20 Sekunden bei 3000U/m zentrifugiert und im Anschluss sofort in den vorbereiteten LightCycler überführt.

**Tab.2: PCR-Protokoll zu TRADD unter Verwendung von SYBR Green 1**

	Inkubations zeit (s)	Temp. (°C)	Temp.rate(°C/s)	Zyklen
Prä- Inkubation	600s	95°C	20°C/s	0
Amplifikation	15s	95°C (Denaturierung)	20°C/s	45
	9s	58°C (Annealing)	20°C/s	
	16s	72°C (Elongation)	20°C/s	
Schmelzkurven- Analyse	0s	95°C	20°C/s	1
	15s	65°C	20°C/s	
	0s	95°C	0,1°C/s	
Kühlung	30s	40°C	20°C/s	0

**Tab.3: PCR-Protokoll zu FADD unter Verwendung von SYBR Green 1**

	Inkubations- Zeit (s)	Temp.(°C)	Temp.rate(°C/s)	Zyklen
Prä- Inkubation	600s	95°C	20°C/s	0
Amplifikation	15s	95°C (Denaturierung)	20°C/s	46
	10s	59°C (Annealing)	20°C/s	
	20s	72°C (Elongation)	20°C/s	
Schmelzkurven- Analyse	0s	95°C	20°C/s	1
	15s	65°C	20°C/s	
	0s	95°C	0,1°C/s	
Kühlung	30s	40 °C	20°C/s	0

**Tab. 4: Stammlösung SYBR Green1 je PCR-Tube + je 2µl cDNA Probe**

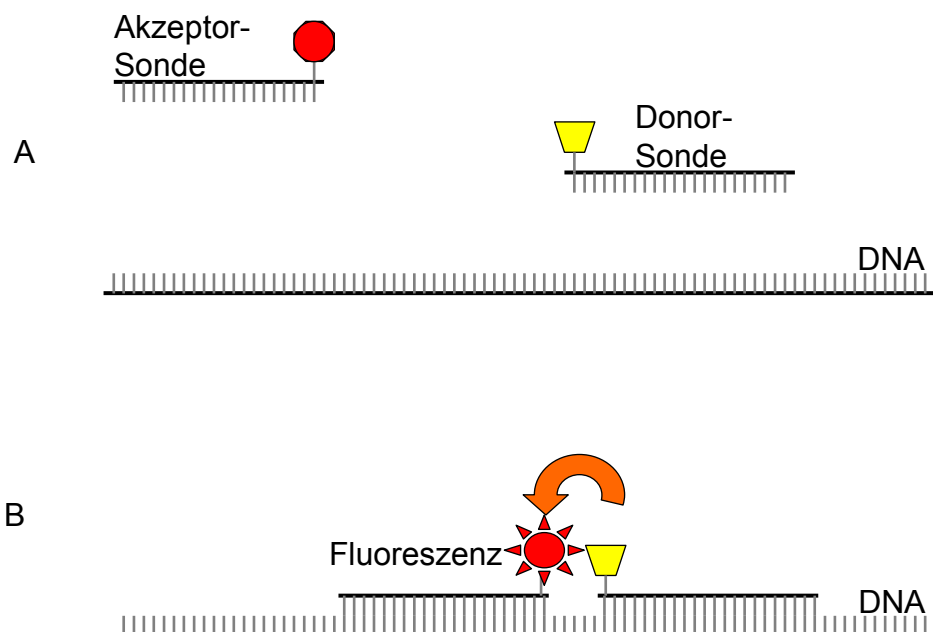
	TRADD	FADD
Ster.H2O in(µl)	11,8µl	12,4µl
MgCl <sub>2</sub> (µl)	1,2µl (2,5mM)	1,6µl (3mM)
DMSO (µl)	1µl (5%)	0
Primer (µl) Vorwärts	1µl (TRADD-F)	1µl (FADD-S)
Primer (µl) Rückw.	1µl (TRADD-as)	1µl (FADD-R)
Faststart -SYBR Green1 Taq-Polymerase(µl)	2µl	2µl

Nach Beendigung des PCR-Laufs wurden die PCR-Rohdaten mittels der LightCycler®Software, Version 3.5, analysiert. Für die Bestimmung des Cp wurden die gemessenen Signale aus dem Fluoreszenz-Kanal 1 herangezogen. Die Software adaptierte dabei automatisch die Fluorimeter-Verstärkung für jeden Messkanal, um eine optimale Darstellung der Fluoreszenzdaten zu erreichen.



### ***Die spezifische Detektion mittels Hybridisierungssonden***

Die Verwendung von Hyprobes ermöglichte einen spezifischen Nachweis des Amplifikationsproduktes. Da die Sonden nur an speziellen Sequenzen der cDNA banden, wurden Artefakte oder Dimerprodukte nicht detektiert. Bei den beschriebenen Hyprobes handelte es sich um zwei zielsequenzspezifische Oligonukleotide, welche mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden waren. Dabei war die eine Sonde an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein (3FL, Donorsonde) und die zweite an dem 5'-Ende mit LightCycler Red 640 (5LC-Red 640, Akzeptorsonde) markiert. Um eine unerwünschte Extension während der Amplifikation zu unterbinden, wurde die freie 3'-Hydroxylgruppe der Akzeptorsonde zusätzlich mit einer Phosphatgruppe blockiert. Diese Oligonukleotide wurden den jeweiligen PCR-Ansätzen zugefügt und banden bei der Amplifikation an der Zielsequenz zwischen den Primern in räumlicher Nähe zu einander. Der Abstand der beiden Sonden zueinander betrug bei TRADD und bei FADD jeweils ein Basenpaar. Die Anregung der Sonden erfolgte nach dem Fluorescence Resonance Energy Transfer-Prinzip (FRET-Prinzip). Nach der Bindung der Sonden an der Ziel-cDNA wurde der Fluorescein-Farbstoff der Donorsonde durch Laserstrahlen angeregt. Durch das Fluorescein, welches kaum Eigenfluoreszenz emittiert, wurde die Energie auf den benachbarten Farbstoff der Akzeptorsonde übertragen. Die Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes LC-Red 640 wurde schließlich durch das LightCycler-System detektiert. Die gemessene Emission war dabei direkt proportional der zum Zeitpunkt der Messung vorhandenen cDNA-Menge.



**Abbildung 2.2 : Die Detektion mittels Hybridisierungssonden**

**A** Die Akzeptor- und die Donatorsonde

**B** Die Emission des Fluoreszenzlichts erfolgt durch Anregung und Interaktion der beiden Sonden. Abbildungen modifiziert nach Giulietti et al., 2001

Die Messung des Signals erfolgte je einmal pro PCR-Zyklus nach der Anlagerung der Primer. Zu diesem Zeitpunkt waren die Hybridisierungssonden noch an den cDNA-Strang gebunden und noch nicht durch die Kettenverlängerung verdrängt worden. Wie auch bei der SYBR-Green1-Methode konnte im Anschluss an einen PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Diese wurde während der Optimierungsphase der PCR mit Hyprobes verwendet um das Bindungsverhalten der Sonden zu überprüfen und die optimale Annealingtemperatur der Primer festzustellen. Weiterhin lies diese Analyse eine Aussage über die Spezifität des Systems zu. Diese Kontrolle hatte jedoch nach Beendigung der Etablierungsphase keine zusätzliche Bedeutung für die Genexpression der zu untersuchenden Faktoren. Sie wurde daher bei den anschließenden Probenmessungen nicht mehr durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des „LightCycler-FastStart-DNA-Master Hybridisation Probes“-Kits nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Als Master-Mix wurde ein gebrauchsfertiger „Hot start“ Reaktionsmix verwendet, durch welchen die Spezifität und Sensitivität der Reaktion verbessert werden konnten. Dieser Mix bestand aus zwei Lösungen welche direkt vor der Verwendung vermischt werden mussten. Zum einen der FastStart-Taq-DNA-Polymerase und zum anderen der Reaktionsmix. Bei der verwendeten Taq- Polymerase handelte es sich ebenfalls um das modifizierte Enzym, welches erst bei Temperaturen über 70°C aktiviert wurde. Des Weiteren beinhaltete der Master-Reaktionsmix die Hyprobes zusätzlich zu den Reagenzien des SYBR-Green-Master-Mix.

Die Etablierungsreaktionen wurden auf Grundlage der SYBR-Green-Versuche durchgeführt. Dabei wurden die Protokolle jedoch geringfügig abgewandelt und der Verwendung der Hyprobes angepasst. Durch Justierung der Temperaturkurven wurden somit die Reaktionsergebnisse optimiert. Die PCR-Rohdaten wurden anschließend mittels der LightCycler Software, Version 3.5, analysiert. Für die Bestimmung der Cp wurde das Verhältnis der im Fluoreszenz-Kanal 2 und der im Fluoreszenz-Kanal 1 gemessenen Signale herangezogen. Die Softwareversion 3.5 adaptierte automatisch die Fluorimeter-Verstärkung für jeden Messkanal um eine optimale Darstellung der Fluoreszenzdaten zu erreichen.

**Tab.5: PCR-Protokoll für TRADD und FADD unter Verwendung von Hyprobes**

	Inkubations Zeit (s)	Temp.(°C)	Temp.rate(°C/s)	Zyklen
Prä-Inkubation	600s	95°C	20°C/s	0
Touch- down	10s	68°C-> 60°C (in 1°C-Schritten)	20°C/s	8
Amplifikation	10s	95°C (Denaturierung)	20°C/s	39
	10s	60°C (Annealing)	20°C/s	
	20s	72°C (Elongation)	20°C/s	
Kühlung	30s	40°C	20°C/s	0

**Tab.6: Stammlösung Hyprobes je PCR-Tube + je 2µl cDNA Probe**

	TRADD	FADD
Ster.H2O in(µl)	9,8µl	10,4µl
MgCl2 (µl)	1,2µl (2,5mM)	1,6µl (3mM)
DMSO (µl)	1µl (5%)	0
Sonde (µl) Akzeptor	1µl (TRADD-LC)	1µl (FADD-LC)
Sonde (µl) Donor	1µl (TRADD-FL)	1µl (FADD-FL)
Primer(µl) Vorwärts	1µl (TRADD-F)	1µl (FADD-S)
Primer (µl) Rückw.	1µl (TRADD-as)	1µl (FADD-R)
Faststart (µl) Taq-Polymerase	2µl	2µl

### 2.2.3.7 Optimierung der PCR-Reaktion

Um die Resultate der PCR-Reaktionen zu verbessern, mussten während der Etablierungsarbeit einige Optimierungsstrategien verfolgt werden. Zunächst wurde durch wiederholte PCR-Versuche die optimale Kombination aus Vorwärts- und Rückwärtsprimern ausgewählt. Des Weiteren wurden die Konzentrationen von Magnesium (1-5mM), Primern und cDNA (10:1-1:100) so weit variiert, bis sich ein gutes PCR-Ergebnis einstellte. Eine weitere Möglichkeit der Optimierung bestand in der Justierung der Temperaturstufen der PCR-Protokolle. Da die Primer der TRADD-Reaktion Sekundärstrukturen aufwiesen, wurde dem TRADD-Reaktionsmix noch das Lösungsmittel DMSO beigelegt. Auch bei dieser Substanz wurde durch mehrmalige Versuche die optimale Konzentration bestimmt (2%-10%). Um die so für SYBR-Green1 entwickelten Protokolle für die Hyprobes-PCR zu adaptieren, musste noch einmal die Magnesiumkonzentration gering verändert werden. Um die Effizienz der Amplifikation zu verbessern, musste bei beiden PCR-Reaktionen das Touchdown-Verfahren angewendet werden. Bei dieser speziellen Methode lag die Annealing-Temperatur zu Beginn

der Reaktion über der optimalen Schmelztemperatur der Primer und wurde innerhalb der folgenden Zyklen in wenigen Schritten reduziert. Auf diese Weise wurde die Bildung unspezifischer Nebenprodukte minimiert, da nur die optimal bindenden Oligonukleotide an der denaturierten Matrize hybridisieren konnten. Da daraufhin nur noch spezifische Produkte amplifiziert wurden, konnte so auch die Effizienz der PCR-Reaktion deutlich gesteigert werden.

#### **2.2.3.8 Erstellung der Standardkurven**

Mit der LightCycler-System-Software konnten für jeden Parameter externe Standardkurven erstellt werden. Diese konnten als separate Dateien hinterlegt und somit in die verschiedenen PCR-Läufe importiert werden. Dafür wurde ein Bereich von 5 Plasmid-Konzentrationen ausgewählt, in welchem sich auch die untersuchte Probanden-cDNA befand. Dieser Bereich erfasste bei FADD und TRADD jeweils die Plasmidverdünnungen zwischen  $10^3$  und  $10^7$  DNA-Kopien. Um die Konstanz der Standardverdünnungen zu unterstreichen und somit verlässliche Kurven zu erstellen, wurden für jeden Verdünnungsbereich 5-fach-Messungen durchgeführt. Zudem wurden die Versuche an mehreren Tagen wiederholt, um die Reproduzierbarkeit dieser Bezugsgrößen zu belegen. Die ausgewählten Standardkurven sollten einen quadratischen Fehler der linearen Regressionsgeraden von weniger als 0,1 und eine ungefähre Steigung von -3,3 besitzen, um eine Amplifikationseffizienz von etwa 2,0 zu erreichen.

Um die erstellten Standardkurven in den gewünschten PCR-Lauf letztendlich zu importieren, musste zusätzlich zu den zu messenden Proben auch eine Plasmid-Probe bekannter Konzentration mitgeführt werden. Für beide Zielparameter wurde hierbei die Standard-Verdünnung von  $10^6$  Kopien gewählt.

#### **2.2.3.9 Die relative Quantifizierung mittels PBGD**

Um Veränderungen der PCR-Produktmengen aufgrund von Faktoren wie der anfänglichen RNA-Menge und Qualität, aber auch Unterschiede im Stadium der cDNA-Synthese zu detektieren und auszugleichen, wurde ein spezieller interner Standard verwendet. Hierbei wurde die endogene Genexpression des Haushaltsgens PBGD als Bezugsgröße gewählt. Die Expression der humanen Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) verläuft in allen Geweben auf einem relativ konstanten Niveau, weitere Pseudogene sind hierbei nicht bekannt [95].

Zudem gehört dieses Referenzgen zu der Klasse der mRNAs mit einem niedrigen Expressionsniveau. Dies qualifiziert die Expressionsdetektion der PBGD als eine geeignete Referenz bei Messungen der Zytokinexpression [95]. Da die PCR-Methode für PBGD als Haushaltsgen im Liquorlabor der Neurologischen Universitätsklinik Giessen bereits etabliert war, konnte auf die schon bestehenden Protokolle und entsprechende Standardkurven zurückgegriffen werden. Im Sinne der relativen Quantifizierung wurde das Haushaltsgen als Bezugsgröße zur Bestimmung der relativen Targetanzahl während der Messungen der Kollektive herangezogen. Dazu wurden die Proben während der klinischen Kollektiv-Messungen auf die Amplifikationseffizienzen bezüglich des endogenen PBGD-Fragments, sowie der festgelegten cDNA-Fragmente untersucht und miteinander in Relation gesetzt.

### ***Interassays / Intraassays***

Die Reproduzierbarkeit der Real-time-RT-PCR wurde durch Intra- und Inter-Assay-Versuche ermittelt. Die Intra-Assay-Präzision wurde durch 10 Wiederholungsmessungen einer Probanden-cDNA innerhalb eines PCR-Laufes bestimmt. Die Effizienz der Reaktionen wurde anschließend unter Verwendung der jeweiligen hinterlegten Standardkurven für TRADD und FADD ermittelt. Die Abweichung der relativen Kopienzahl für beide Proteine lag dabei unter 5%.

Die Intra-Assay Variationen wurden als Wiederholungsmessungen einer Probanden-cDNA an 3 aufeinander folgenden Tagen unter Mitführen einer bestimmten Plasmidstandard-Konzentration durchgeführt. Die Quantifizierung des Produktes wurde ebenfalls unter Verwendung der importierten Standardkurven durchgeführt.

### **2.2.3.10 Die Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese**

Während der Etablierungsphase wurden die Amplifikationsprodukte der PCR-Reaktionen zusätzlich durch eine elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und Polyacrylamidgel auf ihre Zusammensetzung hin überprüft. Mit dieser Methode konnte zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse die optimale Primerkombination ausgewählt werden. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Gießen durchgeführt. Die für die Agarose-Gelelektrophorese benötigten Materialien wie Gelschlitten und Probenpuffer wurden dabei ebenfalls von dem Anatomischen Institut zubereitet und zur Verfügung gestellt.

Als Proben wurden die zu untersuchenden Amplifikationsprodukte der verschiedenen PCR-Reaktionen, die mit unterschiedlichen Primerkonstellationen durchgeführt worden waren eingesetzt. Vor dem Auftragen auf das polymerisierte Gel wurden die cDNA-Lösungen ( 5-10µl) mit einem speziellen Probenpuffer (Endkonzentrationen: Saccharose (40% w/v), Bromphenolblau (0,25% w/v) Xylencyanol FF (0,25% w/v), Orange G2 (0,25% w/v)) versetzt. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert. Daraufhin wurde das beimpfte Gel in der Gelelektrophoresekammer mit TBE-Puffer überspült. Die Auftrennung der cDNA-Fragmente erfolgte dann für etwa 30 Minuten bei 70-80V und variabler Stromstärke und wurde beendet, sobald der Standard das Gel durchlaufen hatte. Im Anschluss wurden die Proben per Transluminator im UV-Licht bei 312nm visualisiert und dokumentiert. Die Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente konnte daraufhin anhand des parallel zu den Proben laufenden Größenstandards durchgeführt werden.

### ***Polyacrylamidgel***

Zum optimalen Nachweis der Amplifikationsprodukte wurde zusätzlich auch eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht, aufgrund der viel feineren Porenbeschaffenheit des Gels, die Auftrennung viel kürzerer DNA-Fragmente. Auch wies das Polyacrylamidgel eine höhere Kapazität als die Agarosegel-Methode auf. Die Konzentration des Gels, welche zwischen 3,5% und 20% liegen kann, bestimmt dabei den Trennbereich. Bei dieser Arbeit wurde ein 6%-Polyacrylamidgel gewählt, dessen optimaler Trennbereich zwischen 50 und 500 Basenparen lag und optimal mit zu der zu erwartenden Produktlänge (bei TRADD z.B. zwischen 371bp (F-rev) und 164 bp (F-A)) paßte. Die Untersuchung der PCR-Produkte per PAGE wurde in Zusammenarbeit mit dem Genetischen Institut des Universitätsklinikums Giessen durchgeführt.

Das Gel wurde unter Verwendung zweier Glasplatten, mehrerer Abstandshalter und eines Kammes gegossen, nach Auspolymerisation in eine Elektrophoresekammer eingespannt und nach Auftragen der Proben an eine Spannungsquelle angeschlossen. Als Proben wurden ebenfalls die zu untersuchenden PCR-Produkte verwendet. Dafür wurden pro Probe je 10µl PCR-Produkt mit 2µl Bromphenolen-Puffer vermischt und auf das Gel pipettiert. Als Elektrophoresepuffer wurde wiederum TBE-Puffer verwendet. Die Dokumentation erfolgte im Anschluss über den UV-Transluminator im UV-Licht bei 312nm.

#### **2.2.4 Die Kollektive**

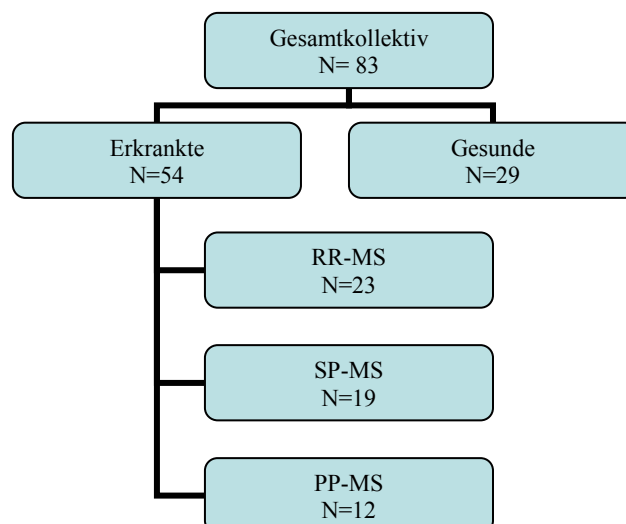
Nach der erfolgreichen Etablierung der quantitativen Real-time RT-PCR wurden ausgewählte Patientenkollektive auf die Genexpression von TRADD und FADD in Leukozyten untersucht. Zusätzlich wurden auch Untersuchungen der Genexpression des Referenzgens PBGD durchgeführt, um durch einen direkten Vergleich relative Amplifikationsergebnisse zu erhalten. Das Gesamtkollektiv wurde dabei aus 4 unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zusammengestellt und umfasste insgesamt 83 Personen. Darunter befanden sich 29 gesunde Untersuchungspersonen und 54 an Multipler Sklerose erkrankte Patienten.

Das Erkranktenkollektiv wurde in 3 Gruppen, nach den unterschiedlichen klinischen Formen der Erkrankung unterteilt. Diese Gruppen wurden aufgliedert in Patienten welche an der RR-MS erkrankt waren, des Weiteren in Patienten welche an SP-MS sowie an PP-MS erkrankt waren. Die Gruppen der Gesunden, der SP-MS-Patienten und der PP-MS-Patienten wurden anhand einer Ein-Punkt-Messung untersucht. Bei der RR-MS-Gruppe wurde zusätzlich eine etwa einjährige Verlaufsbeobachtung mit Untersuchungszeitpunkten in dreimonatigen Abständen durchgeführt. Aufgrund der speziellen Verlaufsform und der mehrmaligen Untersuchungszeitpunkte wurden für die Auswahl der Patienten in das RR-MS-Kollektiv die folgenden Einschlusskriterien beachtet.

Bei den Patienten musste die Schubaktivität bereits 1 Jahr vor dem ersten Untersuchungszeitpunkt bestanden haben. Die Blutentnahmen der Patienten sollten in einem schubfreien Intervall durchgeführt werden, um eine Beeinflussung der Parameter durch die akut erhöhte Entzündungsaktivität während eines Schubes zu vermeiden, die bei der vorliegenden Fragestellung keine Rolle spielte. Dabei wurde festgelegt, dass in diesem Falle keine Probenentnahme im Zeitraum zwischen zwei Wochen vor und vier Wochen nach Schubbeginn erfolgen sollte. Als Schubbeginn wurde hierbei das erste, über 24 Stunden anhaltende Symptom gewertet und konnte anhand der Arztbriefe der MS-Ambulanz der Neurologischen Uniklinik Giessen ermittelt werden. Zusätzlich wurde auf einen vierwöchigen Abstand zwischen Beendigung (letzter Tag) einer eventuell gegebenen Cortisonstoßtherapie und dem Blutentnahmezeitpunkt geachtet. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch interkurrierende Infekte zu vermeiden, wurden auch die Labordaten der teilnehmenden Personen auf Infektparameter wie CRP-Erhöhung und Leukozytose untersucht.

Bei den drei Erkrankten –Kollektiven handelte es sich zum Blutentnahmezeitpunkt stets um hinsichtlich der MS untherapierte Patienten.





*Abb.2.3 : Aufbau des Untersuchungskollektivs*

#### 2.2.4.1 Demografische und immunologische Daten

Neben den molekularbiologischen Parametern wurden auch demografische und immunologische Daten in die Analyse des Kollektivs miteinbezogen. Dazu wurden zusätzlich die Geschlechtsverteilung, das Alter der Untersuchungspersonen, sowie individuelle, die Erkrankung betreffende Daten aufgeführt.

Das Geschlechtsverhältnis des Gesamtkollektivs stellte sich als Frauen: Männern ca.2:1 dar, wobei jedoch verlaufsformspezifische Unterschiede innerhalb der einzelnen Kollektive vorherrschten. Das durchschnittliche Alter der Untersuchungsgruppen befand sich zwischen 54 (Median der PP-Gruppe) und 45 (Median der Gesundengruppe) Jahren. Als weiteres Untersuchungsmerkmal wurden zudem noch die Krankheitsdauer und der Grad der Behinderung (EDSS), sowie bei der RR-MS-Patientengruppe die Anzahl der Schübe im Untersuchungszeitraum von einem Jahr aufgeführt. Als Expanded Disability Status Score (EDSS) wird dabei die Leistungsskala bezeichnet, welche Auskunft über den Schweregrad der Behinderung bei Patienten mit MS ermöglicht. Dieser Score umfasst die Bereiche von 0 (unauffälliger neurologischer Befund) bis einschließlich 10 (Tod infolge der MS) in 0,5-Schritten und konnte durch die neurologische Untersuchung ermittelt werden. Die Dokumentation der Schübe erfolgte anamnestisch und diagnostisch im Rahmen der dreimonatigen Vorstellungstermine in der MS-Ambulanz der Neurologischen Klinik des

Universitätsklinikums Giessen. Die im Patientenkollektiv gelisteten Score-Werte wurden somit jeweils den Untersuchungszeitpunkten zugehörigen Arztbriefen entnommen.

### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit und unter Beratung durch die AG für Medizinische Statistik des Institutes für Medizinische Informatik der Universität Giessen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte bei linksgipfelter Verteilung der Parameter als explorative Datenanalyse. Hierbei wurden die erhobenen Daten als Median, Minimum, Maximum und Quartile angegeben. Da es sich unter den beschriebenen Parametern teilweise um stetige und nicht normalverteilte Merkmale handelte, wurde somit eine nichtparametrische Betrachtung im Sinne eines Rangsummentestes durchgeführt. Der diskrete Parameter Geschlecht wurde nach dem exakten Test von Fisher analysiert. Die weiteren Parameter der Patientenkollektive wurden mittels des Kruskal-Wallis-Testes zur Untersuchung von mehr als zwei Gruppen, und des Median-Testes betrachtet. Hierzu wurden die Gruppen der MS-Patienten untereinander, sowie auch mit dem Kontrollkollektiv der Gesunden verglichen. In der Verlaufsuntersuchung der Patienten-Gruppe mit schubförmiger MS-Form erfolgte die Auswertung der Daten anhand der Friedmann-Rang-Varianz-Analyse.

### 3 Ergebnisse

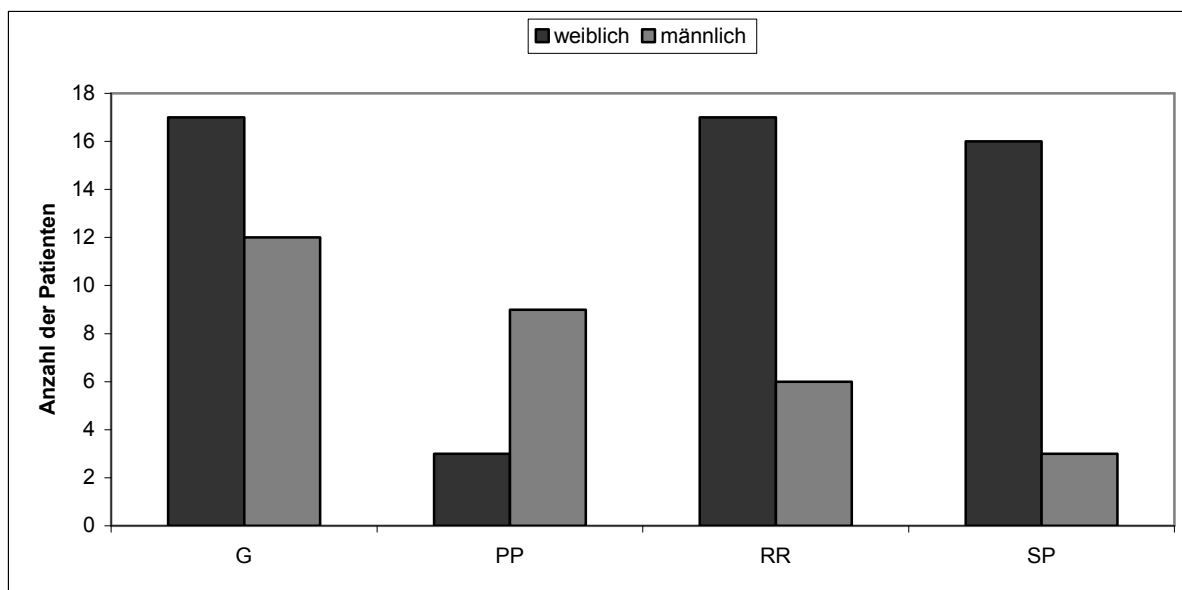
#### 3.1 Vergleich der drei Kollektive mit unterschiedlicher MS-Verlaufsform und des Gesundenkollektivs

##### 3.1.1. Betrachtung der Kollektive in Hinsicht auf Alter und Geschlecht

Die im Abschnitt „Material und Methoden“ dieser Arbeit schon ausführlich beschriebenen Kollektive wurden bezüglich der Alters- und Geschlechtsverteilung der jeweiligen Gruppen untersucht und statistisch verglichen. Die diskrete Variable Geschlecht wurde dabei mit dem exakten Test nach Fisher, die Altersverteilung der Kollektive mit nichtparametrischen Tests (Kruskall-Wallis-H-Test und Median-Test) analysiert.

Das aus insgesamt 83 Probanden bestehende Gesamtkollektiv setzte sich aus 29 gesunden Untersuchungspersonen, 12 Patienten mit PP-MS, 23 Patienten mit RR-MS und 19 Patienten mit SP-MS zusammen. Dieses Gesamtkollektiv setzte sich aus 53 weiblichen und 30 männlichen Untersuchungspersonen zusammen. Innerhalb der einzelnen Gruppen fanden sich die folgenden Geschlechtsverteilungen:

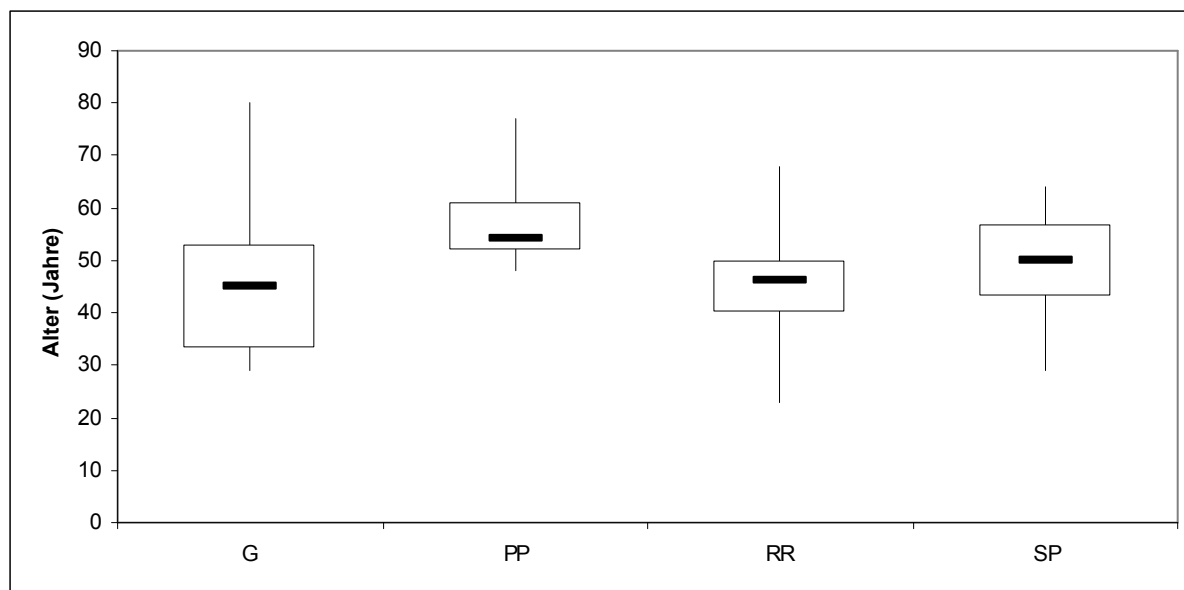
Die Gruppe der Gesunden bestand aus 17 Frauen (58,62%) und 12 Männern (41,38%). Bei der Gruppe der PP-MS-Erkrankten fanden sich 3 weibliche (25%) und 9 männliche (75%) Probanden. Die Untersuchungsgruppe der RR-Patienten bestand aus 17 weiblichen (73,91%) und 6 männlichen Teilnehmern (26,09%). Unter den Patienten mit der sekundär progredienten Verlaufsform fanden sich 16 Frauen (84,21%) und 3 Männer (15,79%). Der Aufbau der einzelnen Kollektive im Hinblick auf die Verteilung der Geschlechter wird in der **Abbildung 3.1** dargestellt. Diese Verteilung zeigt einen Unterschied in der Geschlechtsverteilung der jeweiligen Gruppen, entsprechend ergab die statistische Berechnung einen Unterschied in der Geschlechtsverteilung der verschiedenen Gruppen mit  $p = 0,0063$  im exakten Test nach Fisher.



**Abbildung 3.1: Geschlechtsverteilung innerhalb der verschiedenen Kollektive**

Dargestellt ist die Geschlechtsverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen : Gesunde (G;  $n=29$ ; w:17; m: 12), primär chronisch progrediente Verlaufsform (PP;  $n=12$ ; w: 3; m: 9), schubförmige Verlaufsform (RR;  $n=23$ ; w: 17; m: 6) sowie sekundär chronisch progrediente Verlaufsform (SP;  $n=19$ ; w: 16; m: 3) im Vergleich zueinander. Exakter Test nach Fisher :  $p=0,0063$ .

Die Altersverteilung der jeweiligen Gruppen wurde als stetige Variable durch Median, Minimalwert, Maximalwert und erstes bzw. drittes Quartil angegeben. In der Gruppe der Gesunden befanden sich Probanden zwischen 29 (Minimum) und 80 Jahren (Maximum). Das erste Quartil (Q1) wurde mit 33 Jahren, das dritte Quartil (Q3) mit 53 Jahren bestimmt. Innerhalb dieses Intervalls lag der Median mit 45 Jahren. Der Altersbereich des PP-MS-Kollektivs erstreckte sich von 48 Jahren (Minimum) bis zu 77 Jahren (Maximum). Innerhalb dieses Kollektivs lagen Q1 mit 52 Jahren, der Median mit 54 Jahren und Q3 mit 61 Jahren. Das Alter der Gruppe der Patienten mit RR-MS verteilte sich von 23 Jahren (Min.) über Q1 von 40 Jahren, den Median von 46 Jahren und Q3 von 50 Jahren bis zum Maximalalter von 68 Jahren. Die Patientengruppe SP-MS umfasste Altersbereiche von minimal 29 Jahren bis maximal 64 Jahren. Q1 lag bei 43 Jahren, der Median bei 50 Jahren und Q3 bei 57 Jahren. Die **Abbildung 3.2** bietet einen Überblick über den Altersaufbau der jeweiligen Gruppen. In der statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-H-Test und Median-Test zeigte sich, dass sich die jeweiligen Gruppen bezüglich des Alters voneinander unterscheiden ( $p=0,0067$  im Kruskal-Wallis-H-Test,  $p= 0,0041$  im Median-Test).



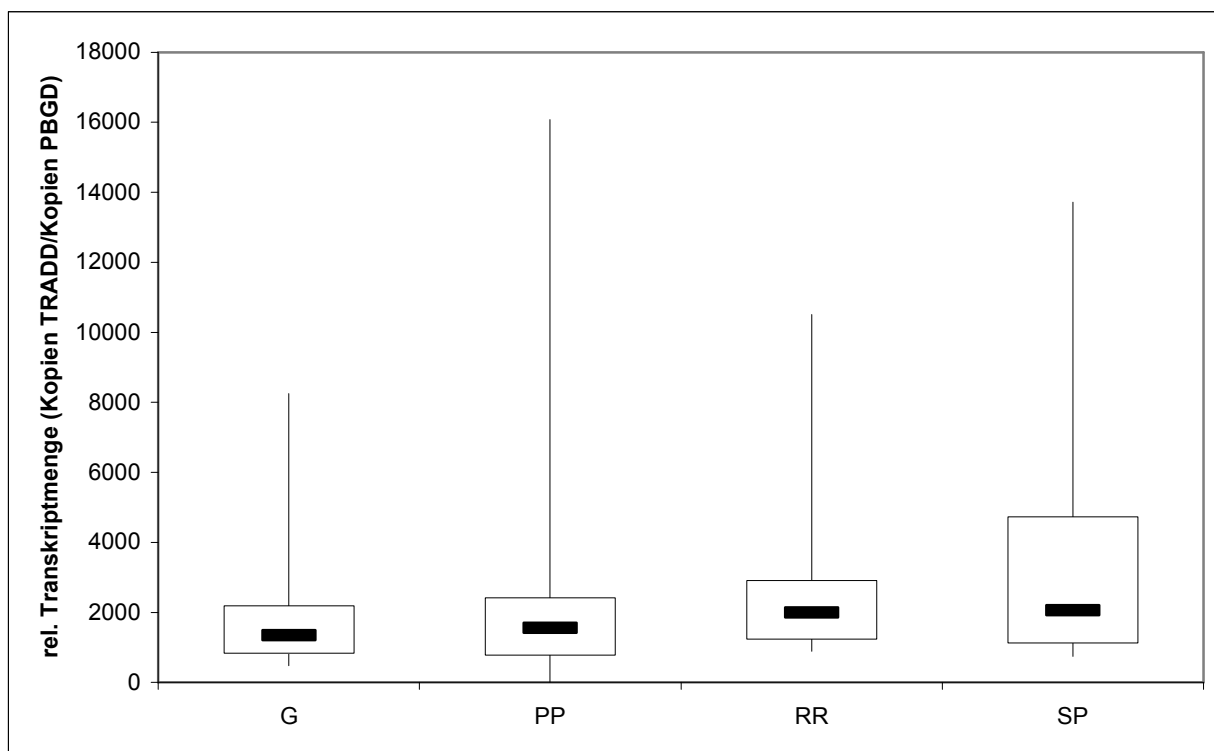
**Abbildung 3.2: Altersverteilung innerhalb der einzelnen Kollektive**

Dargestellt ist die Altersverteilung innerhalb der Gesunden (G,  $n=29$ ), der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,0067$ . Median-Test:  $p=0,0041$ .

### 3.1.2 Genexpression des Parameters TRADD

Für die Erfassung der Genexpression der TNF-Rezeptor assoziierten Proteine TRADD und FADD wurde zunächst die Methode der Real-time RT-PCR unter Verwendung von Hybridisierungs sonden und externen Plasmidstandards für diese spezielle Fragestellung etabliert. Dabei wurde, wie schon in „Material und Methoden“ ausführlich besprochen methodisch vorgegangen. Um die relative Transkription an TRADD und FADD zu erhalten, wurden die so erfassten Daten mit der Transkriptmenge des Haushaltsgens PBGD in Relation gesetzt (Kopien Parameter/Kopien PBGD).

Für die jeweiligen Kollektive ergaben sich in der Einzelmessung des Parameters TRADD somit die folgenden Werte: In der Gesundengruppe lies sich der mediane Wert von 1347,085 bei einem Minimalwert von 474,227 und einem Maximalwert von 8246,883, sowie Q1 von 829,06 und Q3 von 2201,04 ermitteln. Bei der Untersuchung der PP-MS-Kollektivs wurde die relative Transkription für TRADD von minimal 2,014 (Min.) bis maximal 16078,67 (Max.), bei einem medianen Wert von 1560,737, sowie Q1 von 780,803 und Q3 von 2428,289 gemessen. In der Patientengruppe RR-MS ergaben sich Werte von 888,598 (Minimum) bis 10507,12 (Maximum), der Median lag bei 1995,887, Q1 bei 1233,824 und Q3 bei 2916,1. Die mediane relative Transkription bei Untersuchung der SP-MS-Gruppe ergab 2058,089, bei einem Intervall zwischen 738,263 (Minimum) und 13717,61 Kopien (Maximum) sowie Q1 von 1126,23 und Q3 bei 4742,722. Die Expression des Parameters TRADD in den vier unterschiedlichen Kollektiven wird in **Abbildung 3.3** grafisch veranschaulicht. Die statistische Auswertung mittels des Kruskal-Wallis-H-Testes ( $p= 0,0544$ ) und des Median-Testes ( $p= 0,1416$ ) ergab keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen hinsichtlich der Genexpression des untersuchten Parameters.



**Abbildung 3.3: Die Expression des Parameters TRADD in den vier Kollektiven**

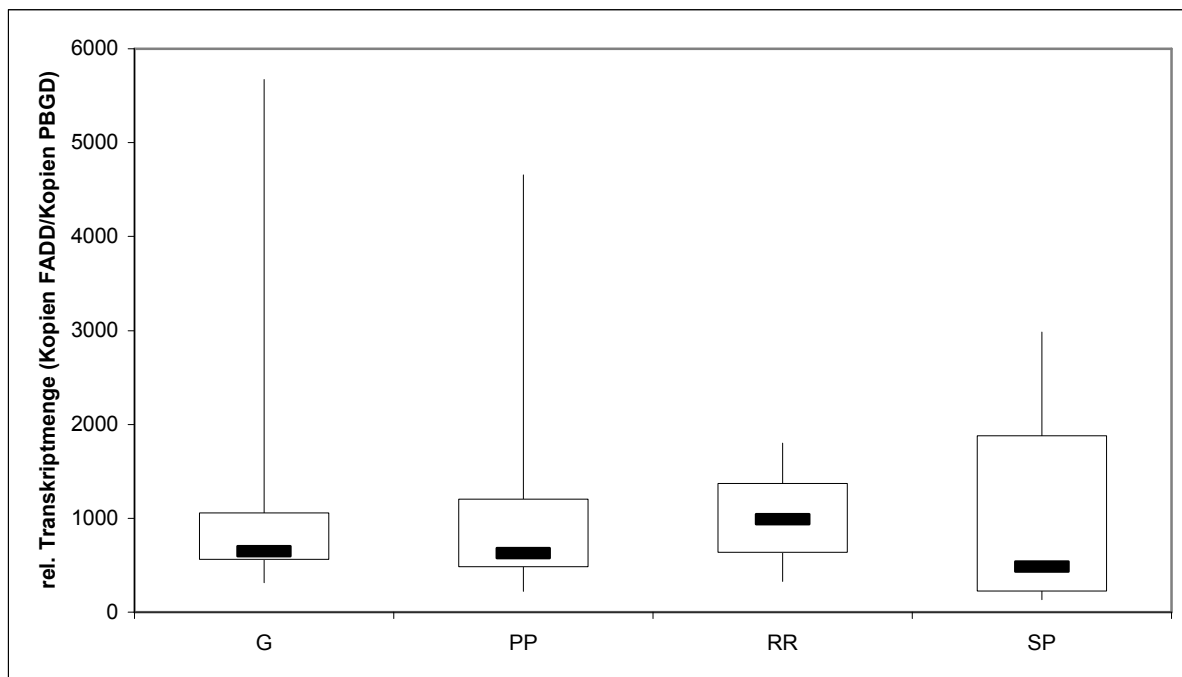
Dargestellt ist die Expression des Parameters TRADD innerhalb der Gesunden (G,  $n=29$ ), der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Die Werte sind als relative Transkription auf der Ordinate aufgetragen. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,0544$ . Median-Test:  $p=0,1416$ .

### 3.1.3 Genexpression des Parameters FADD

Bei der Einpunkt-Messung des Parameteres FADD konnten die folgenden relativen Werte in den verschiedenen Kollektiven ermittelt werden:

In der Gruppe der Gesunden konnten Werte von 313,879 FADD (Minimum) bis 5673,317 (Maximum) gemessen werden. Der Median in dieser Gruppe lag bei 649,593, Q1 bei 561,347 sowie Q3 bei 1060,427. Bei der Untersuchung der Patienten PP-MS lagen die Messwerte im Intervall zwischen minimal 220,447 und maximal 4655,939. Der Median wurde zu 627,87, Q1 bei 482,795 und Q3 bei 1207,265 ermittelt. Für das Kollektiv der Patienten RR-MS wurden Werte zwischen 328,446 (Minimum) und 1799,715 ermittelt. Der Median in dieser Gruppe wurde zu 990,9, Q1 bei 328,446 und Q3 bei 1374,067 bestimmt. Die Messungen innerhalb der Erkranktengruppe mit SP-MS ergaben Werte von minimal 134,158 Kopien und maximal 2983,389 Kopien, mit dem Median bei 483,392 sowie Q1 bei 226,323 und Q3 bei 1884,140. In der **Abbildung 3.4** wird die Expression des Parameters FADD in den einzelnen Untersuchungsgruppen grafisch dargestellt. Diese Darstellung ergibt einen Hinweis auf eine unterschiedliche Genexpression des Parameters in den einzelnen Gruppen. Die erhaltenen Daten wurden anhand des Kruskal-Wallis-Testes ( $p=0,2577$ ) und des Median-Testes ( $p=0,0534$ ) analysiert. Hierbei ergaben sich somit bei Betrachtung des Median-Testes diskrete Hinweise auf einen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen bezüglich der Genexpression des Parameters FADD.





**Abbildung 3.4: Expression des Parameters FADD in den einzelnen Kollektiven**

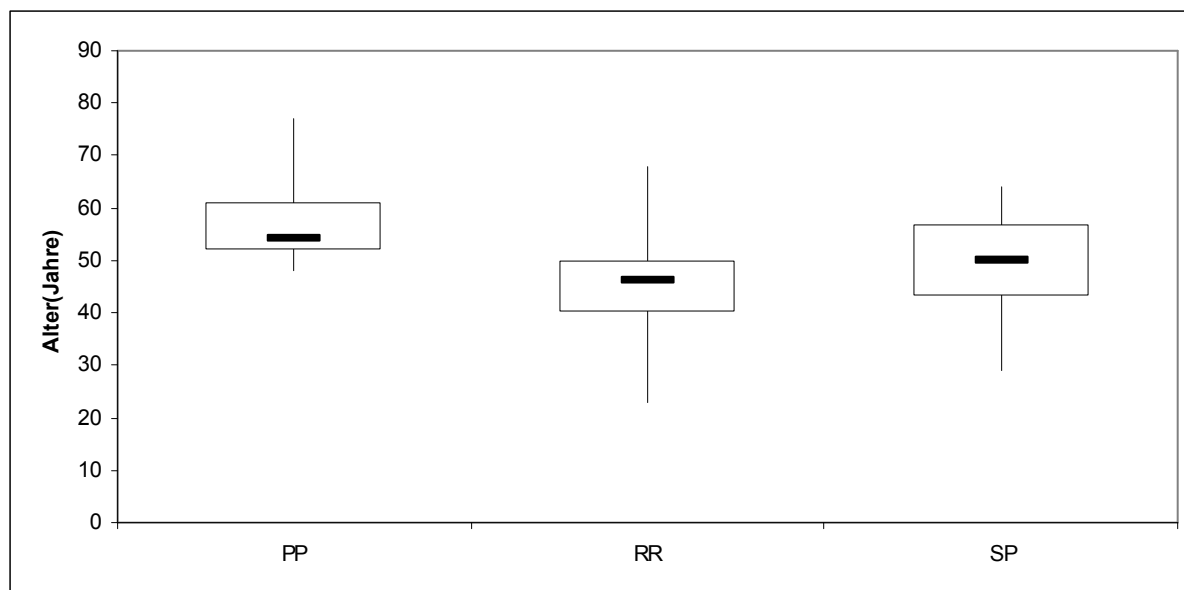
Dargestellt ist die Expression des Parameters FADD innerhalb der Gesunden (G,  $n=29$ ), der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Die Werte sind als relative Transkription auf der Ordinate aufgetragen. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,2577$ . Median-Test:  $p=0,0534$ .

### **3.2. Vergleich der MS-Kollektive**

Zusätzlich zu der statistischen Analyse aller 4 Kollektivgruppen wurde auch ein Vergleich nur der an MS erkrankten Gruppen durchgeführt. Hierbei wurden die Daten ebenfalls nichtparametrisch anhand des Kruskal-Wallis-Testes zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen, sowie zusätzlich mit dem Median-Test analysiert. Diese statistische Auswertung dieser Kollektive ermöglichte eine zusätzliche Betrachtungsweise der ermittelten Parameter TRADD und FADD. Zudem wurden die Erkrankten-Kollektive auch im Alters- und Geschlechtsaufbau miteinander verglichen. Die diskrete Variable der Geschlechtverteilung der 3 Kollektive wurde hierbei anhand des exakten Testes nach Fisher untersucht. Des Weiteren wurden die Gruppen bezüglich mehrerer erkrankungsspezifischer Parameter nichtparametrisch miteinander verglichen. Hierbei wurden speziell die Erkrankungsdauer, der EDSS zur Beurteilung des Behinderungsgrades durch die Erkrankung sowie die Anzahl der Schübe während des Untersuchungszeitraums und der Progressionsindex der Erkrankung aufgeführt.

#### **3.2.1 Betrachtung der MS-Kollektive hinsichtlich des Alters**

Die drei Gruppen der an MS erkrankten Patienten wurden bezüglich ihres Altersaufbaus miteinander verglichen. Die  $H_0$ -Hypothese wurde als „es liegt kein Unterschied zwischen den einzelnen Kollektiven vor“ definiert. Die deskriptive Auswertung der einzelnen Altersdaten stellte sich, wie bereits in „Betrachtung der 4 Kollektivgruppen“ dargestellt, dar und konnte somit übernommen werden. Die Daten wurden anhand des Kruskal-Wallis-Testes ( $p=0,0047$ ) und des Median-Tests ( $p=0,012$ ) analysiert. Es ergab sich somit der Hinweis auf einen globalen Unterschied in der Altersverteilung der einzelnen Gruppen im Vergleich zueinander. Die Altersverteilung der drei verschiedenen Erkranktengruppen wird in der **Abbildung 3.5** grafisch verdeutlicht.

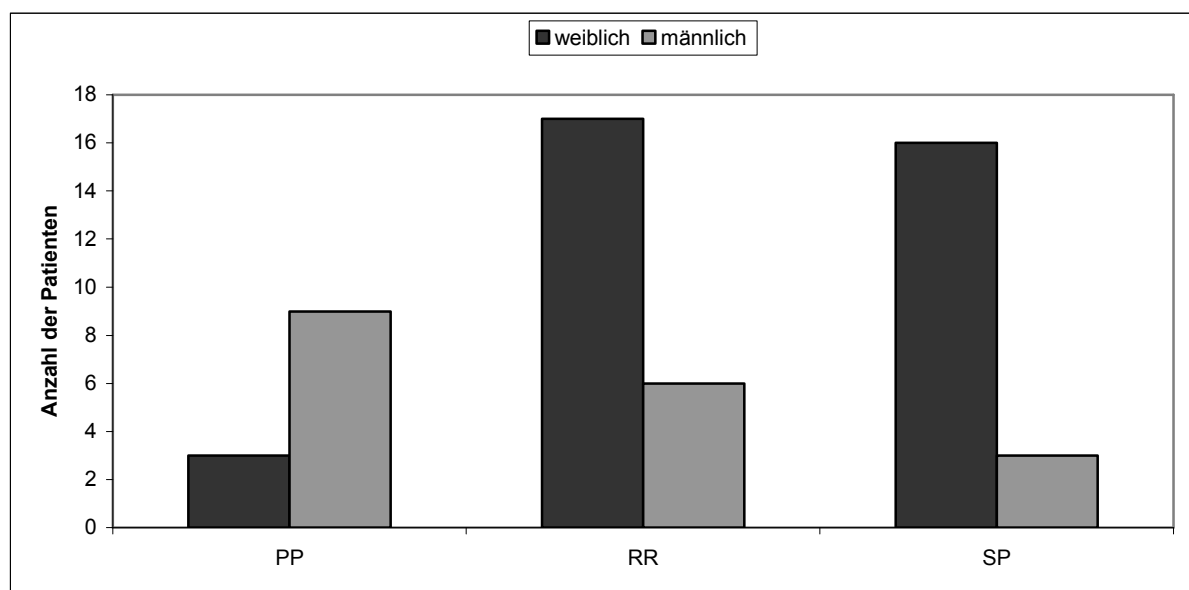


**Abbildung 3.5: Altersverteilung innerhalb der Erkranktenkollektive**

Dargestellt ist die Altersverteilung innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,0047$ . Median-Test:  $p=0,012$ .

### 3.2.2 Betrachtung der MS-Kollektive hinsichtlich des Geschlechts

Zusätzlich erfolgte auch ein Vergleich der drei MS-Kollektive in Bezug auf die Verteilung des Geschlechts innerhalb der Gruppen. Hierbei konnten die Daten der untersuchten Gruppen ebenfalls aus dem vorangehenden Abschnitt „3.1.1. Betrachtung der Kollektive in Hinsicht auf Alter und Geschlechtsverteilung“ übernommen werden. Es erfolgte eine statistische Auswertung mit dem exakten Test nach Fisher. Anhand der Analyse ergab sich ebenfalls ein Hinweis auf einen Unterschied in der Geschlechtsverteilung innerhalb der drei Gruppen ( $p = 0,0029$ ). Der Gruppenaufbau im Hinblick auf das Geschlecht der Untersuchungspersonen ist in der **Abbildung 3.6** grafisch dargestellt.



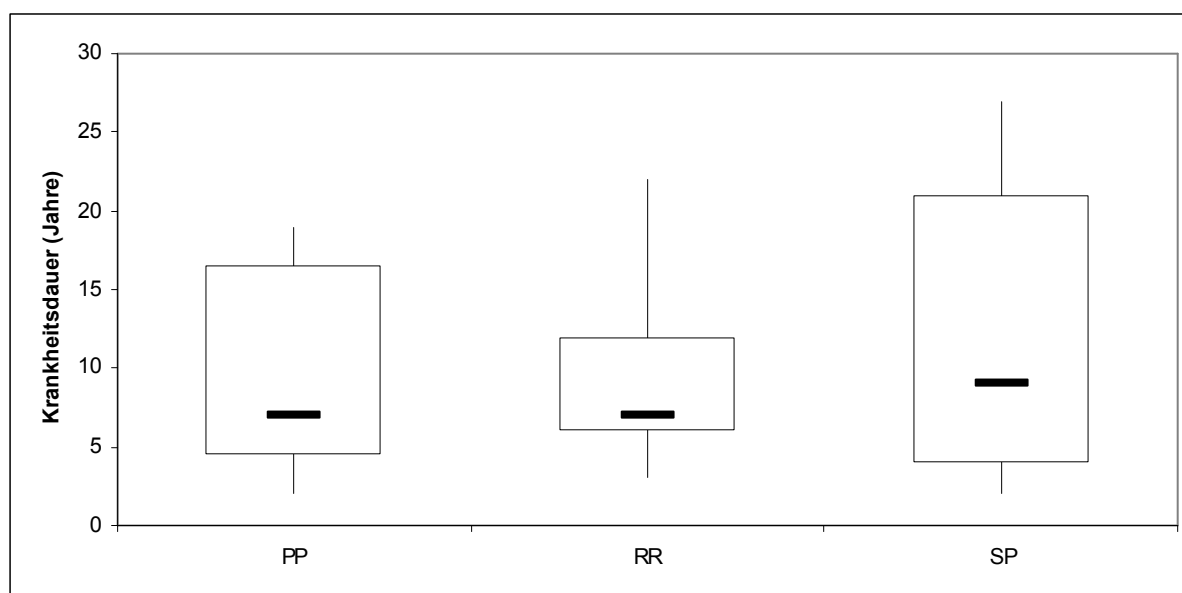
**Abbildung 3.6: Geschlechtsverteilung innerhalb der Erkranktenkollektive**

Dargestellt ist die Geschlechtsverteilung innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ; w: 3; m: 9), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ; w: 17; m: 6) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ; w: 16; m: 3) im Vergleich zueinander. Exakter Test nach Fischer:  $p=0,0029$ .

### 3.2.3 Betrachtung MS-Kollektive in Hinsicht auf die Krankheitsdauer

Des Weiteren wurde auch die Dauer der MS-Erkrankung innerhalb der verschiedenen MS-Patienten-Gruppen untersucht. In der deskriptiven Auswertung der drei Gruppen bezüglich der Krankheitsdauer ergaben sich die folgenden Werte:

In der Gruppe der Patienten mit PP-MS wurden Erkrankungsdauern zwischen minimal 2 Jahren und maximal 19 Jahren ermittelt, wobei als mediane Dauer 7 Jahre, als Q1 4,5 Jahre und als Q3 16,5 Jahre festgestellt wurden. Die Auswertung des Kollektivs der Patienten mit RR-MS ergab eine mediane Krankheitsdauer von 7 Jahren. Als kürzeste Dauer wurden in dieser Gruppe 3 Jahre (Minimum), als längste 22 Jahre (Maximum) bestimmt. Weiterhin wurden Q1 bei 4,5 Jahren und Q3 bei 12 Jahren ermittelt. Die Dauer der MS-Erkrankung in der SP-MS-Gruppe erstreckte sich zwischen 2 (Minimum) und 27 Jahren (Maximum), der Median wurde bei 9 Jahren, Q1 bei 4 Jahren sowie Q3 bei 21 Jahren bestimmt. Die statistische Analyse erfolgte anschließend anhand des Kruskal-Wallis-Testes ( $p=0,8469$ ) und des Median-Testes ( $p=0,6541$ ). Somit ergab sich kein Hinweis auf einen Unterschied bezüglich der Erkrankungsdauer zwischen den drei Gruppen. Die **Abbildung 3.7** stellt die Variable Erkrankungsdauer in den unterschiedlichen Kollektiven grafisch dar.



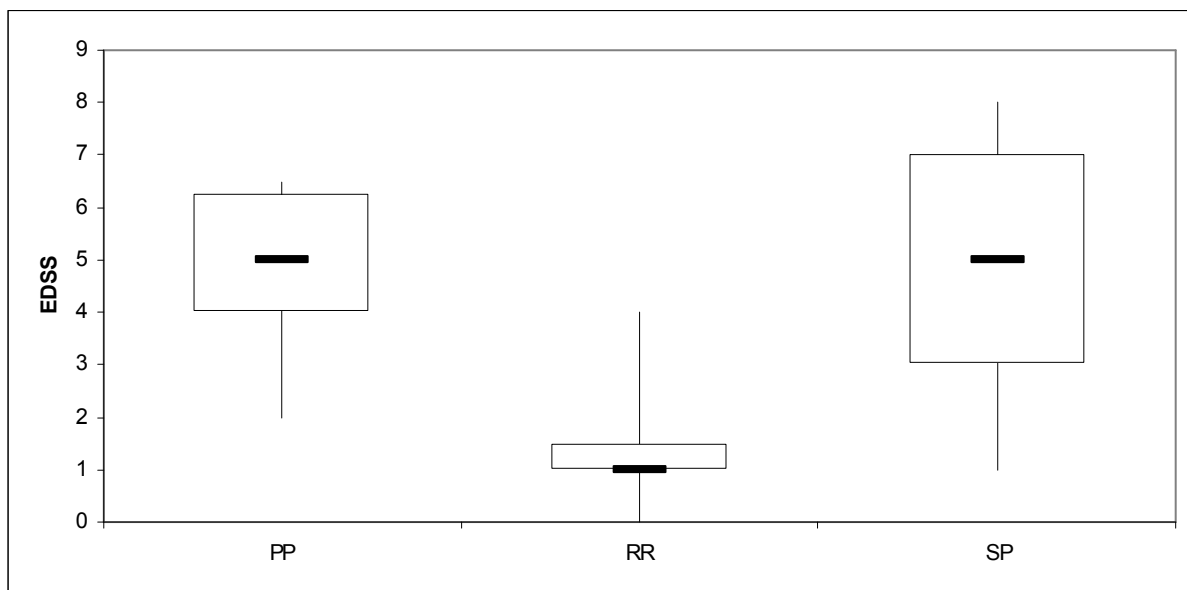
**Abbildung 3.7: Krankheitsdauer der MS-Erkrankung**

Dargestellt ist die Krankheitsdauer der MS-Erkrankung innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,8469$ . Median-Test:  $p=0,6541$ .

### 3.2.4 Betrachtung MS-Kollektive in Hinsicht auf Baseline und EDSS

Als ein weiterer krankheitsspezifischer Parameter wurde der Grad der Behinderung anhand des EDSS-Wertes zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bei den unterschiedlichen MS-Kollektiven untersucht. Hierbei wurden die folgenden Werte ermittelt:

In der Gruppe der Patienten mit PP-MS wurden Werte zwischen 2,0 (Minimum) und 6,5 (Maximum) festgestellt. Q1 lag bei 4,0, der mediane Wert bei 5,0 und Q3 bei 6,25. In der Gruppe der Patienten mit RR-MS ergaben sich EDSS-Werte von minimal 0,0 bis maximal 4,0. In diesem Kollektiv wurde Q1 bei 1,0, der mediane Wert bei 1,0 und Q3 bei 1,5 bestimmt. In der Gruppe der Patienten mit SP-MS fand sich mit 0,8 der höchste EDSS-Wert der Untersuchung. Der Minimalwert lag in dieser Gruppe bei 1,0, Q1 bei 3,0, der Median bei 5,0 und Q3 bei 7,0. Auch diese Daten wurden anhand des Kruskal-Wallis-Tests ( $p < 0,0001$ ) und des Median-Tests ( $p < 0,0001$ ) ausgewertet. Die Analyse ergab damit einen deutlichen Hinweis auf einen globalen Unterschied bezüglich des EDSS-Wertes zwischen den drei Krankheitskollektiven. Die erhobenen Daten in den verschiedenen Erkranktengruppen sind in der **Abbildung 3.8** graphisch dargestellt.

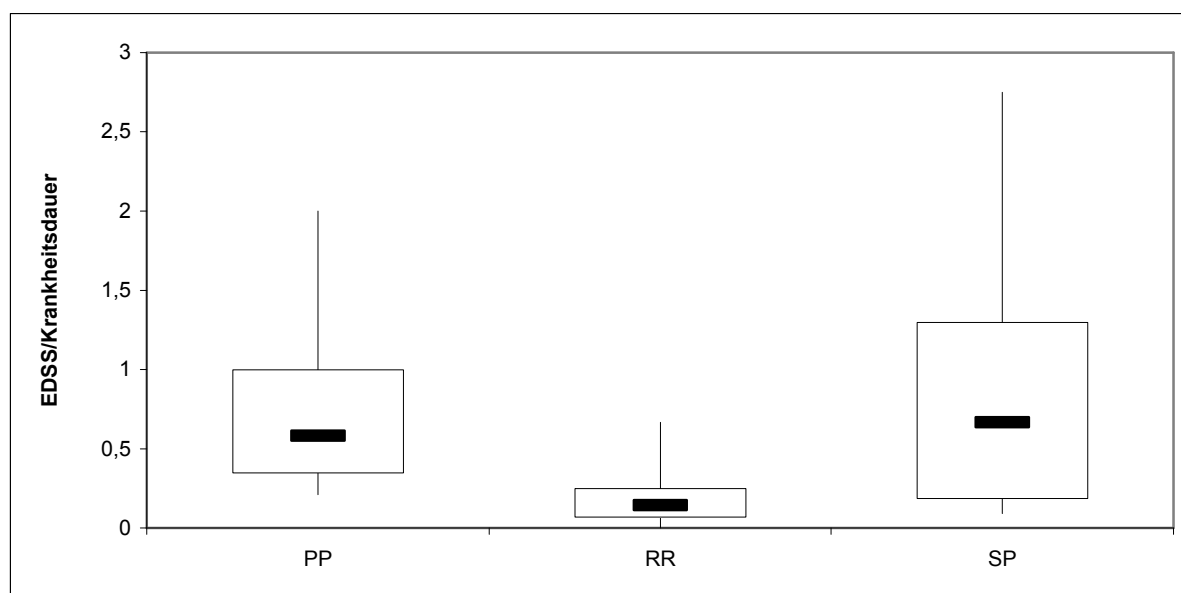


**Abbildung 3.8: Grad der Behinderung (EDSS)**

Dargestellt ist der Grad der Behinderung der an MS-Erkrankten innerhalb der Gruppe mit primär chronischer progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ) im Vergleich zueinander. Auf der Ordinate ist der EDSS-Score aufgetragen. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p < 0,0001$ . Median-Test:  $p < 0,0001$ .

### 3.2.5 Betrachtung der MS- Kollektive in Hinsicht auf den Progressionsindex

Des Weiteren wurde als MS-spezifische Variable der individuelle Progressionsindex der Erkrankung in den unterschiedlichen Erkrankten-Kollektiven beurteilt. Er trifft eine Aussage zum Verlauf und Fortschreiten der Erkrankung. Dieser Index wird aus dem Verhältnis des EDSS-Wertes zu der Krankheitsdauer der MS-Erkrankung berechnet. Somit wurden in der deskriptiven Auswertung der drei Kollektive folgende Daten erhoben: In der Gruppe der Patienten mit PP-MS wurden Werte zwischen 0,122 (Minimum) und 2,0 (Maximum) ermittelt. Der mediane Wert befand sich bei 0,583 (Median), Q1 bei 0,347 und Q3 bei 1,0. Die Auswertung des Kollektivs mit RR-MS ergab Werte zwischen 0,0 (Minimum) und 0,668 (Maximum). Der Median lag in dieser Gruppe bei 0,143, Q1 bei 0,068 und Q3 bei 0,25. In der Gruppe der Patienten mit SP-MS wurden Werte zwischen minimal 0,091 und maximal 2,75 erhoben. Der mediane Wert in diesem Kollektiv wurde zu 0,667, Q1 bei 0,185 und Q3 bei 1,3 bestimmt. Die ermittelten Daten wurden anhand des Kruskal-Wallis-H-Tests ( $p \leq 0,0001$ ) und des Median-Tests ( $p = 0,001$ ) statistisch analysiert. Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass ein Hinweis auf einen Unterschied zwischen den verschiedenen Erkrankten-Kollektiven in Bezug auf den Progressionsindex besteht. Die erhobenen Progressionsindex-Daten in den jeweiligen Gruppen sind in der **Abbildung 3.9** grafisch dargestellt

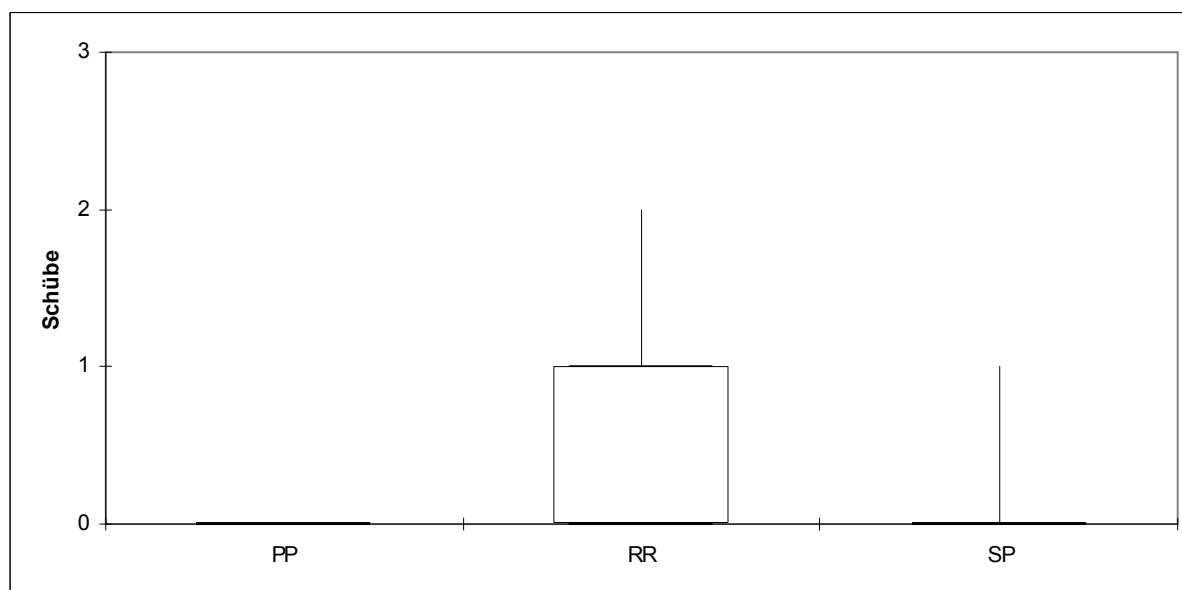


**Abbildung 3.9: Progressionsindex der MS-Erkrankung**

Dargestellt sind die Progressionsindices (EDSS-Wert / Krankheitsdauer) der MS innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Die Werte sind als Verhältnis EDSS-Wert / Krankheitsdauer aufgetragen. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p < 0,0001$ . Median-Test:  $p = 0,001$ .

### 3.2.6 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf die Schubanzahl

Zudem wurden die Kollektive der MS-Patienten auch hinsichtlich der Anzahl der Erkrankungsschübe während der Beobachtung miteinander verglichen. Hierbei wurde bei der Gruppe der Patienten mit PP-MS erwartungsgemäß keinerlei Schubaktivität festgestellt. In der Gruppe der Patienten mit RR-MS fanden sich Verläufe mit maximal 2 Schüben und minimal 0 Krankheitsschüben. Als Median wurde in dieser Gruppe der Wert von 1 MS-Schub während der Untersuchungszeit, als Q1 0 Schübe und als Q3 1 Schub ermittelt. Im Kollektiv der Patienten mit SP-MS wurde hingegen nur der maximale Wert von 1 Schub erhoben (min=0, Q1=0, median=0, Q3=0). In der **Abbildung 3.10** ist die Schubanzahl in den drei Krankenkollektiven dargestellt. Die erhobenen Daten wurden anhand des Kruskal-Wallis-H-Tests ( $p < 0,0001$ ) und des Median-Tests ( $p < 0,0001$ ) statistisch ausgewertet. Damit konnte festgestellt werden, dass sich die einzelnen Kollektive im Hinblick auf die Schubanzahl voneinander unterscheiden.



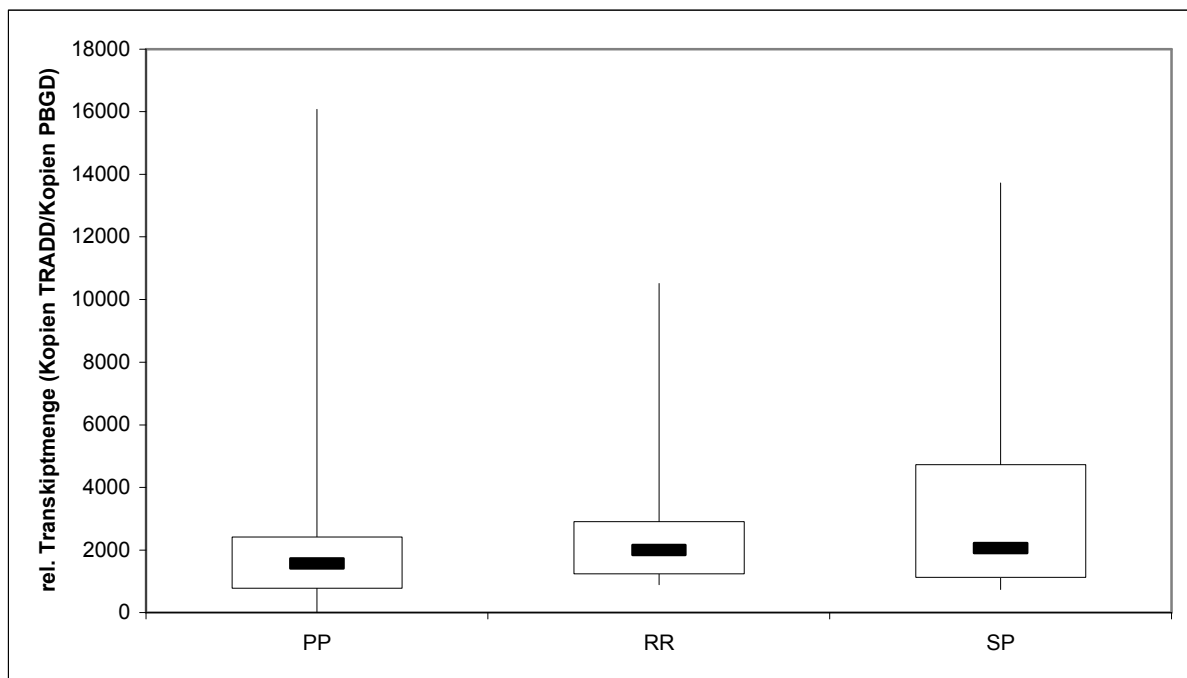
**Abbildung 3.10: Schubanzahl innerhalb der Erkranktenkollektive**

Dargestellt ist die Anzahl der Erkrankungsschübe innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP) im Vergleich zueinander. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p < 0,0001$ . Median-Test:  $p < 0,0001$ .



### 3.2.7 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf TRADD

Die drei Kollektive der an MS erkrankten Patienten wurden in Hinblick auf die Genexpression des TRADD miteinander verglichen. Die in der deskriptiven Auswertung erhobenen Daten bezüglich dieses Parameters wurden in Abschnitt 3.1.2 bereits aufgelistet und konnten für die drei Gruppen somit übernommen werden. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test ( $p=0,4932$ ) und dem Median-Test ( $p=0,4033$ ) statistisch analysiert. Hiermit konnte ebenfalls, wie auch im Vergleich aller 4 Untersuchungsgruppen, kein direkter Hinweis auf einen Unterschied zwischen den drei Gruppen der Erkrankten bezüglich des Parameters TRADD ermittelt werden. Die Expression des untersuchten Parameters in den verschiedenen Gruppen ist in der **Abbildung 3.11** verdeutlicht.

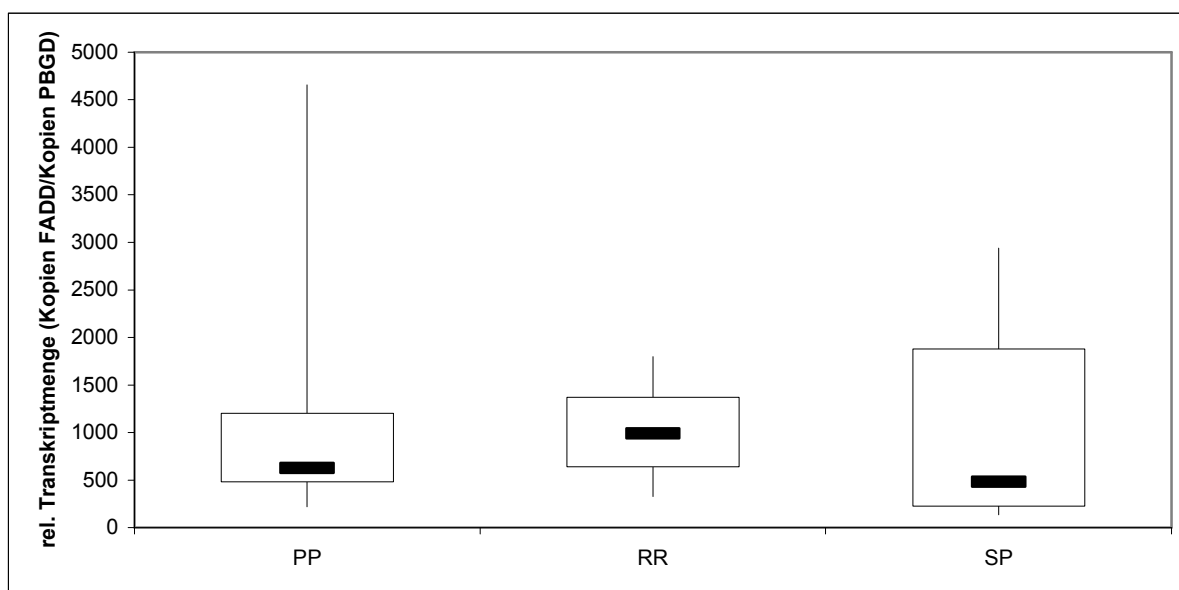


**Abbildung 3.11 : Expression des Parameters TRADD innerhalb der Erkranktenkollektive**

Dargestellt ist die Expression des Parameters TRADD innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Die Werte sind als relative Transkription aufgetragen. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,4932$ . Median-Test:  $p=0,4033$ .

### 3.2.8 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf FADD

Die drei Kollektive der MS-Patienten wurden ebenfalls auf die Genexpression des FADD-Proteins hin miteinander verglichen. Auch hierbei konnten die für die Analyse benötigten Daten, wie bereits beschrieben, übernommen werden. Es erfolgte eine statistische Auswertung anhand des Kruskal-Wallis-H-Tests ( $p=0,1936$ ) und des Median-Tests ( $p=0,0484$ ). Im Sinne der Analyse ergab sich damit in Betrachtung des Median-Testes der Hinweis auf eine unterschiedliche Genexpression des untersuchten Parameters FADD im Vergleich der einzelnen Untersuchungsgruppen. In der **Abbildung 3.12** ist die Genexpression des Proteins FADD innerhalb der drei MS-Kollektive grafisch erläutert.



**Abbildung 3.12: Expression des Parameters FADD innerhalb der Erkranktenkollektive**

Dargestellt ist die Expression des Parameters FADD innerhalb der Gruppe mit primär chronisch progredienter Verlaufsform (PP;  $n=12$ ), der Gruppe mit schubförmiger Verlaufsform (RR;  $n=23$ ) sowie der Gruppe mit sekundär chronisch progredienter Verlaufsform (SP;  $n=19$ ;) im Vergleich zueinander. Die Werte sind als relative Transkription aufgetragen. Kruskal-Wallis-H-Test:  $p=0,1936$ . Median-Test:  $p=0,0484$ .

### 3.3 Betrachtung des RR- Kollektivs im Verlauf

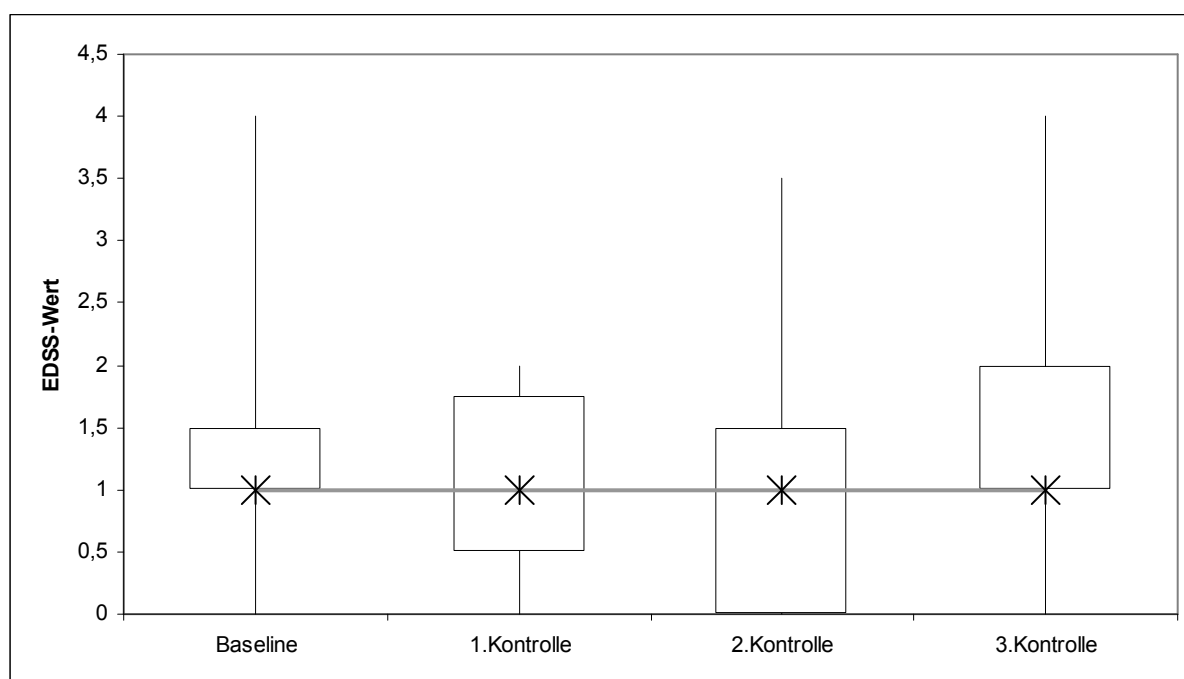
Neben den bereits beschriebenen Einpunkt-Untersuchungen innerhalb der verschiedenen Kollektive wurde die Gruppe der Patienten mit RR-MS einer Verlaufsbetrachtung mit mehreren Messpunkten unterzogen. Die untersuchte Patientengruppe bestand dabei aus 20 der 23 Probanden des RR-MS-Kollektivs und setzte sich aus 14 Frauen (70%) und 6 Männern (30%) zusammen. Die Untersuchungsreihe beinhaltete die Erhebung der klinischen Daten bezüglich des EDSS-Scores sowie der Genexpression der Proteine TRADD und FADD. Diese Daten wurden zu 4 Kontroll-Zeitpunkten innerhalb eines Jahres in Abständen von 3 Monaten ermittelt. Der Zeitpunkt der Erstuntersuchung wurde als „Baseline“ bezeichnet, die drei folgenden Zeitpunkte als erste, zweite und dritte Kontrolle. Der Studiendesign sowie besondere Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurden bereits in „Material und Methoden“ ausführlich behandelt. Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte anhand der Friedmann-Rang-Varianz-Analyse. Dabei wurde sowohl ein Vergleich aller vier Zeitpunkte (n=15) als auch ein Vergleich nur der Baseline und der ersten zwei Kontrollzeitpunkte durchgeführt (n=19).

#### 3.3.1 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf den EDSS

Bei der zunächst durchgeführten Verlaufsbeschreibung des Behinderungsgrades durch die Erkrankung anhand des EDSS-Scores wurden die folgenden Werte bestimmt:

Zu Beginn der Beobachtung (Baseline) konnte bei den 20 Probanden Werte zwischen minimal 0,0 und maximal 4,0 ermittelt werden. Der mediane EDSS-Wert sowie Q1 wurden bei 1,0, Q3 bei 1,5 festgestellt. Zum Zeitpunkt der ersten Kontrolle (n=20) ergaben sich Werte zwischen 0,0 (Minimum) und 2,0 (Maximum). Der Median zu diesem Untersuchungszeitpunkt lag bei 1,0, Q1 bei 0,5 und Q3 bei 1,75. Zum Zeitpunkt der zweiten Kontrolle (n=19) ergaben sich Werte im Intervall von 0,0 (Minimum) bis 3,5 (Maximum), als Median wurde ein Wert von 1,0, Q1 bei 0,0 und Q3 bei 1,5 festgelegt. Zum Ende des Untersuchungszeitraums (3. Kontrolle) konnten in der Probandengruppe (n=15) Werte von minimal 0,0 bis maximal 4,0 erhoben werden. Desweiteren wurden der Median bei 1,0, Q1 bei 1,0 und Q3 bei 2,0 ermittelt. Die Verlaufsbeobachtung der Werte zu den vier Untersuchungszeitpunkten ist in **Abbildung 3.13** grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte im Sinne der Friedmann-Rang-Varianzanalyse. Bei der Analyse aller vier Kontrollzeitpunkte ( $p=0,0409$ ,  $n=15$ ) ergab sich dabei ein Hinweis auf eine Änderung des Behinderungsgrades (EDSS) während der 1-jährigen Verlaufsuntersuchung. Bei der

Auswertung nur der ersten drei Zeitpunkte ( $p=0,5992$   $n=19$ ) ergab sich wiederum kein Hinweis auf eine globale Änderung des Scores.



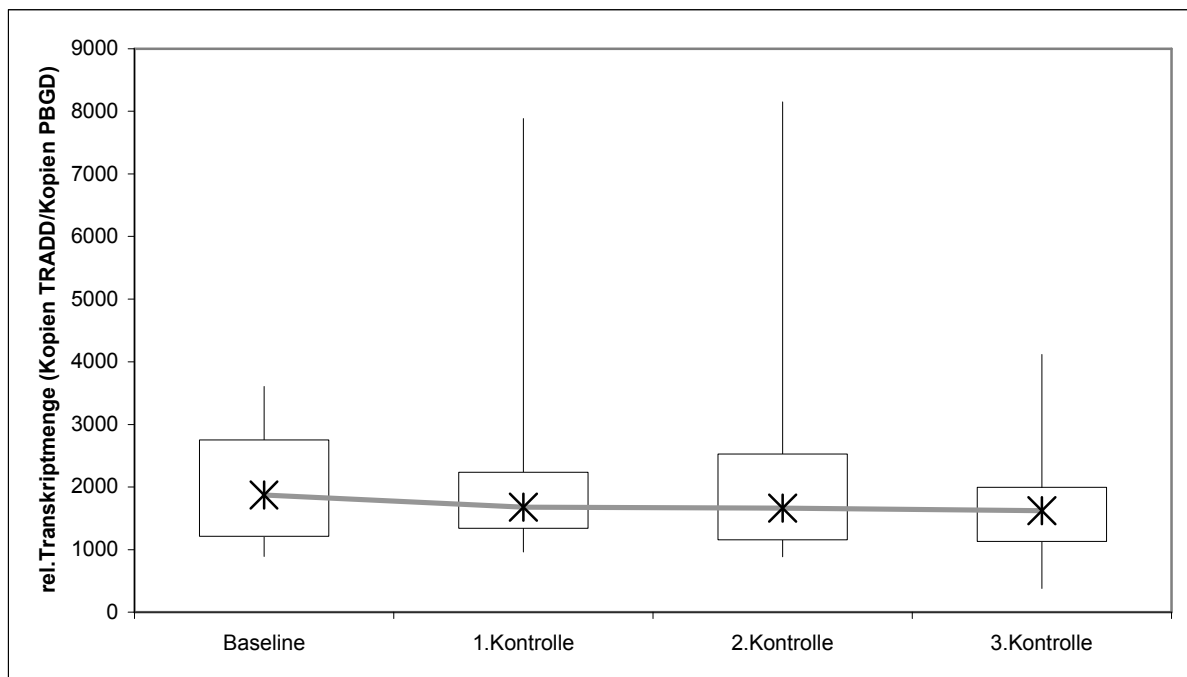
**Abbildung 3.13: Grad der Behinderung (EDSS) im Verlauf**

Dargestellt ist der Grad der Behinderung im Verlauf von etwa 12 Monaten zu vier Untersuchungszeitpunkten im Abstand von jeweils 3 Monaten innerhalb der Gruppe der an schubförmiger MS erkrankten Patienten (RR;  $n=20$ ). Die Werte sind als EDSS-Werte aufgetragen. Friedman-Rang-Varianz-Analyse bei Betrachtung aller vier Kontrollen:  $p=0,0409$ ,  $n=15$ . Friedman-Rang-Varianz-Analyse bei Betrachtung der ersten drei Kontrollen:  $p=0,5992$ ;  $n=19$

### 3.3.2 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf TRADD

Bei den Messungen der Expression des TRADD-Proteins ergab sich im Verlauf der vier Untersuchungszeitpunkte die folgende relative Transkription:

Zu Beginn der Verlaufsuntersuchung (Baseline, n=20) wurden bei den Patienten Werte zwischen minimal 888,598 und maximal 3606,343 gemessen. Der mediane Wert wurde zu 1873,03, Q1 bei 1214,536 und Q3 bei 2756,762 relativer TRADD-Transkription ermittelt. Nach etwa 3 Monaten (1. Kontrolle n=20) wurden Werte von 959,858 (Minimum) bis 7884,679 (Maximum) erhoben. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Median bei 1679,697, Q1 bei 1342,831 und Q3 bei 2239,229 ermittelt. Zum Zeitpunkt der zweiten Kontrollmessung (2. Kontrolle n=19) wurden relative TRADD-Werte von minimal 884,451 bis maximal 8149,654 bestimmt. Der Median lag zu diesem Zeitpunkt bei 1660,777, Q1 bei 1155,119 und Q3 bei 2534,435. Zum Ende der Verlaufsbeobachtung (3. Kontrolle, n=15) wurden Werte zwischen 381,032 (Minimum) und 4117,647 (Maximum) relativen Kopien gemessen. Hierbei wurde der mediane Wert bei 1622,941, Q1 bei 1130,795 und Q3 bei 2000,533 bestimmt. Die Darstellung der Genexpression des TRADD im Verlauf der vier Untersuchungszeitpunkte bei Patienten mit RR-MS ist in der **Abbildung 3.14** grafisch aufgearbeitet. Die gemessenen Werte wurden anhand der Friedmann-Rang-Varianz-Analyse ausgewertet. Hierbei ergab sich bei der Auswertung aller vier Untersuchungszeitpunkte ( $p=0,9319$ ,  $n=15$ ) kein Hinweis auf eine globale Veränderung des Parameters im Verlauf des Untersuchungszeitraumes von einem Jahr. Auch bei der Analyse nur der ersten drei Zeitpunkte ( $p=0,9487$ ,  $n=19$ ) ergab sich kein Hinweis auf eine Veränderung bezüglich der Expression des TRADD-Proteins.



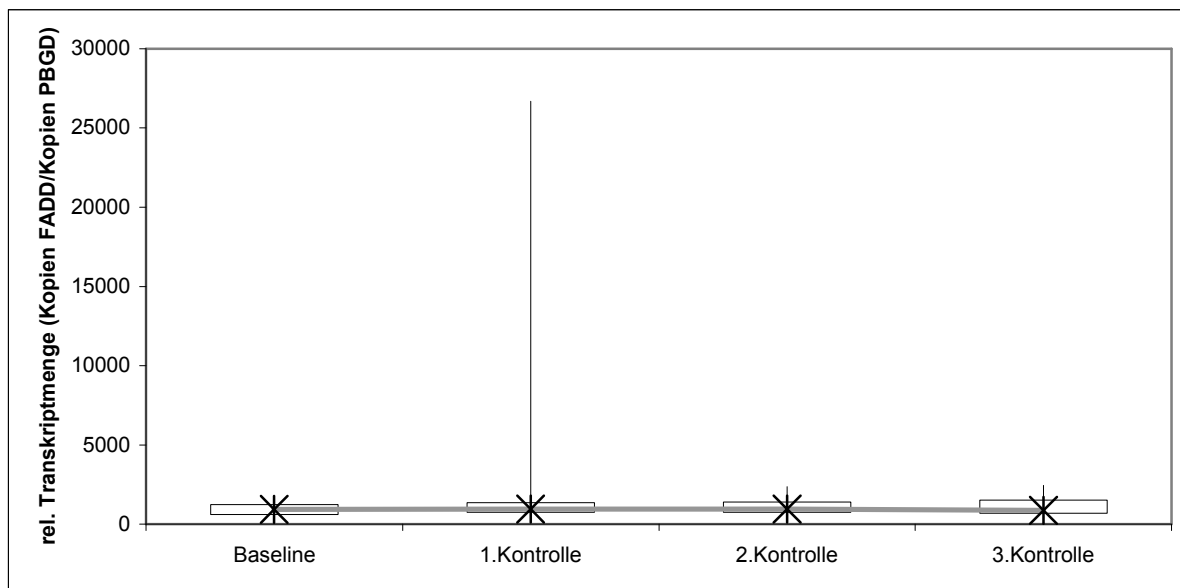
**Abbildung 3.14: Expression des Parameters TRADD im Verlauf**

Dargestellt ist die Expression des Parameters TRADD im Verlauf von etwa 12 Monaten zu vier Untersuchungszeitpunkten im Abstand von jeweils 3 Monaten innerhalb der Gruppe der an schubförmiger MS erkrankten Patienten (RR;  $n = 20$ ). Die Werte sind als relative Transcription aufgetragen. Friedmann-Rang-Varianz-Analyse bei Betrachtung aller vier Untersuchungszeitpunkte:  $p = 0,9319$ ,  $n = 15$ . Friedmann-Rang-Varianz-Analyse bei Betrachtung der ersten drei Kontrollen:  $p = 0,9487$ ;  $n = 19$ .

### 3.3.3 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf FADD

Bei der Verlaufsuntersuchung des FADD wurden die folgenden Werte erhoben:

Als Baseline-Werte (n=20) wurde eine relative Transkription von 328,446 (Minimum) bis 1730,311 (Maximum) ermittelt. Der mediane Wert lag zu Beginn der Untersuchung bei 936,555, Q1 bei 616,48 und Q3 bei 1251,981. Zum Zeitpunkt der ersten Kontrolle (n=20) wurden Werte zwischen 194,243 bis 26681,63 gemessen. Als Median wurden zu diesem Zeitpunkt 945,207, Q1 bei 750,421 und Q3 bei 1373,523 ermittelt. Zum zweiten Kontrollzeitpunkt (2. Kontrolle, n=19) wurden Werte von minimal 381,955 bis maximal 2359,089 bestimmt. Des Weiteren wurde der mediane Wert dieser Messung bei 959,15, der Q1 bei 748,907 und der Q3 bei 1413,092 ermittelt. Am Ende der Untersuchung (3. Kontrolle, n=15) wurden Werte zwischen 341,777 (Minimum) und 2446,4 (Maximum) erhoben. Der mediane Wert wurde bei 871,088, Q1 bei 690,64 sowie Q3 bei 1533,032 bestimmt. Die Expression des FADD-Proteins bei Patienten mit RR-MS im Verlauf von 12 Monaten wird in der **Abbildung 3.15** veranschaulicht. Die gemessenen Daten wurden anhand der Friedman-Rang-Varianz-Analyse statistisch ausgewertet. Hierbei ergab sich sowohl bei Analyse aller vier Zeitpunkte ( $p=0,7244$ ;  $n=15$ ), wie auch bei der Auswertung der ersten drei Untersuchungszeitpunkte ( $p=0,9487$ ;  $n=19$ ) kein Hinweis auf eine Änderung der Genexpression des FADD-Proteins im Verlauf der 4 Kontrollzeitpunkte.



**Abbildung 3.15: Expression des FADD-Proteins im Verlauf**

Dargestellt ist die Änderung der Expression des FADD-Proteins im Verlauf von etwa 12 Monaten zu vier Untersuchungszeitpunkten im Abstand von jeweils 3 Monaten innerhalb der Gruppe der an schubförmiger MS erkrankten Patienten (RR;  $n = 20$ ). Die Werte sind als relative Transkription aufgetragen. Friedman-Rang-Varianz-Analyse bei Betrachtung aller vier Untersuchungszeitpunkte:  $p=0,7244$ ,  $n=15$ . Friedman-Rang-Varianz-Analyse bei Betrachtung der ersten drei Untersuchungszeitpunkte:  $p=0,9487$ ;  $n= 19$ .



## 4 Diskussion

### 4.1 Zytokine und Multiple Sklerose

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten ausführlich beleuchtet, präsentiert sich die MS sowohl in ihrem klinischen Auftreten als auch in ihrem pathogenetischen Erscheinungsbild als eine Erkrankung mit außerordentlich ausgeprägter Heterogenität [8]. Die größte Herausforderung, der sich die MS-Forschung hierbei heutzutage stellen muss, ist das Verständnis und die Aufklärung der auslösenden Faktoren dieser demyelinisierenden Erkrankung [4]. In der Vergangenheit lag der Fokus der MS-Forschung dabei auf den immunologischen Hintergründen und inflammatorischen Vorgängen der Erkrankung. In den letzten Jahren jedoch wurden die Schwerpunkte des Forschungsinteresses auf die Analyse der Mechanismen immuninduzierter Zerstörung und Regeneration des neuronalen Gewebes gerichtet [31]. In den vergangenen Jahren lieferte auch die konsequente Untersuchung der immunopathologischen Abläufe bei der MS wesentliche neue Erkenntnisse zur Pathogenese dieser Erkrankung [32].

Dabei kommt es zu einer perivaskulären Infiltration mononukleärer Zellen welche sich schließlich in einer Schädigung der Myelin-Nervenscheiden auswirken [101]. An diesem pathologischen Geschehen scheinen auch autoreaktive T-Lymphozyten beteiligt zu sein, die über Fähigkeiten, verfügen in das ZNS einzudringen und daraufhin eine Schädigung des neuronalen Gewebes einzuleiten [10]. Der programmierte Zelltod, der weitestgehend durch die Apoptose charakterisiert ist, zeigt sich hierbei als der maßgebende physiologische Mechanismus in der Homeostase des Immunsystems. Unter physiologischen Bedingungen spielt die Apoptosereaktion eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Anzahl und Aktivität der T-Lymphozyten in der Peripherie. Zudem wird die Apoptose dieser Zellen auch als ein wichtiger anti-autoimmuner Mechanismus angesehen, welcher im Stande ist mögliche pathogene autoreaktive Lymphozyten aus dem Blutkreislauf und dem Gewebe zu eliminieren [102]. Bei Personen, die an MS erkrankt sind, scheinen die autoreaktiv wirksamen T-Zellen weniger sensibel gegenüber dem induzierten Zelltod zu sein als T-Zellen gesunder Individuen [103]. Dementsprechend könnte bei MS-Patienten diese Resistenz der T-Lymphozyten gegenüber der Apoptose das Überleben der zirkulierenden, autoreaktiven Zellen verlängern [104]. Dies könnte wiederum zu einem Anstieg der ins ZNS migrierten autoreaktiven Zellen und somit zu einer Persistenz des Entzündungsgeschehens, sowie auch zu einer Entmarkung und axonaler Schädigung im ZNS führen [105]. Darüber hinaus konnte anhand des Modells

der EAE dargestellt werden, dass eine Apoptose autoreaktiver T-Zellen im Gehirn vor allem im Remissionsstadium eines Erkrankungsschubes vermehrt vorzuherrschen scheint [103].

In den letzten Jahren konnte eine Reihe apoptoseinduzierender Systeme aus sogenannten „Todes“-Rezeptoren (engl.: death ligands) und zugehörigen Liganden ermittelt werden. Dabei spielen das Zytokin TNF und seine assoziierten Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 (TNRSF1A und -1B) eine bedeutende Rolle [103]. So konnte die Arbeitsgruppe um Bachmann anhand eines Mausmodells der EAE die maßgebliche Beteiligung des TNF-R1 am induzierten Zelltod der T-Lymphozyten darstellen [106]. An der Signaltransduktion der unterschiedlichen Signalwege des Zytokins über die bereits besprochenen TNF-Rezeptoren sind zudem auch weitere, den Rezeptoren assoziierte Adapterproteine beteiligt [65;77;83]. Das TRADD stellt hierbei den Scheideweg zwischen dem proapoptotischen und dem anti-apoptotischen, also dem pro-inflammatorischen Signalweg des TNF-R1 dar [68]. Es kann dabei über die Interaktion mit dem Adapterprotein FADD via Kaspasenaktivierung die Apoptose einleiten [82]. Weiterhin kann mittels TRADD auch über Interaktionen mit TRAF2 und RIP über die Aktivierung von NF $\kappa$ B und JNK ein proentzündlicher Signalweg beschriftet werden [75]. Auch der TNF-R2 scheint ebenfalls via Aktivierung von TRAF2 hauptsächlich antiapoptotische Mechanismen anzuregen. Beide TNF-Rezeptoren scheinen dabei jedoch in engem Kontakt, unter anderem über TRAF2, zu stehen. Somit scheint auch eine Apoptoseeinleitung über TNF-R2 sowie TRAF2 über Wechselwirkungen mit TNF-R1 möglich [91]. Diese überaus komplizierten Zusammenhänge des Zytokins TNF, seiner Rezeptoren und Adapterproteine wurden bereits ausführlich im einleitenden Kapitel 1.2.3 dieser Dissertationsarbeit beleuchtet.

Die Bedeutung dieses speziellen Rezeptor-Liganden-Systems für die Pathogenese der MS erscheint aufgrund der vielschichtigen Zusammenhänge, unterschiedlichen Signalwege und Wechselwirkungen noch äußerst komplex. Ein genauer Nachweis der Zusammenhänge auf der Ebene der Adapterproteine fand bis dato noch nicht statt. Somit wurde, um mögliche immunologische Erkrankungsmechanismen zu beleuchten, im Rahmen dieser Dissertationsarbeit die Genexpression der an der Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren beteiligten Komponenten TRADD und FADD bei den unterschiedlichen Verlaufsformen der MS analysiert. Weiterhin wurde in einer Parallelarbeit die Genexpression zwei weiterer Adapterproteine der TNF-Rezeptoren-Signalwege, RIP und TRAF2 untersucht.

Für die Untersuchung der Genexpression der interessierenden Komponenten in humanen Leukozyten wurde die Methode der quantitativen Real-time reversen Transkriptase-PCR

angewendet. Aktuell stellt diese Methode wohl die sensitivste und genaueste Verfahrensweise dar, mRNA quantitativ zu analysieren. Vor allem kann hierbei auch die Genexpression von Bestandteilen, welche auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert werden, wie etwa Zytokine, genau untersucht werden [99]. Hierbei liegt aber auch ein Nachteil dieser äußerst genauen Untersuchungsart. Die Amplifikation der zu untersuchenden Bestandteile stellt einen exponentiellen Prozess dar. Somit können bereits kleinste Veränderungen einer der vielen Variablen, welche die Reaktionsgeschwindigkeit steuern, wie etwa Konzentrationschwankungen der Reaktionsenzyme, der DNA, Magnesium oder Kontamination zu einer gravierenden Veränderung des Ergebnisses führen [54].

Und auch ein striktes und kontrolliertes Einhalten der Experimentprotokolle, wie in dieser Arbeit durchgeführt, kann gewisse Variabilitäten innerhalb der Versuchsreihen nicht unterbinden. Jedoch kann durch Minimierung dieser Fehlerquellen, wie etwa durch Verwendung von automatisierten PCR-Cyclern, wie in dieser Arbeit, sowie die Benutzung von fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden die Zytokin-Quantifizierung optimiert werden [54]. Diese „real time“ Methode erlaubt eine Erfassung der Untersuchungsergebnisse in Echtzeit. Damit bietet diese spezielle Technik eine schnellere und somit korrektere Messtechnik im Vergleich zu der herkömmlichen Endpunkt-Analyse der konservativen PCR-Methoden. Eine zusätzliche Bearbeitung der Proben nach der PCR entfällt bei dieser Methode [95]. Somit unterliegt das endgültige Ergebnis keiner weiteren Veränderung durch mögliche Fehlerquellen wie Kontamination und Messfehler.

Darüber hinaus zeichnet sich die Real-time RT-PCR als leicht reproduzierbare Untersuchungsmethode aus. Zudem kann sie im Gegensatz zu Protein-assoziierten- Methoden auch an unstimulierten Zellen erfolgen. Jedoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass eine erhöhte Expression bestimmter mRNA-Abschnitte nicht stets auch ein Korrelat auf dem Niveau der Proteine haben muss. Auch über mögliche, der Translation nachgeschaltete Veränderungen, lässt diese spezielle Untersuchungsmethode keine Aussagen zu [105].

Wie bereits im Abschnitt 1.1.4. dieser Dissertationsarbeit ausführlich beschrieben, stellt sich das klinische, als auch das pathologische Bild der Erkrankung sowohl interindividuell als auch intraindividuell stark heterogen dar. Das klinische Spektrum dieser Erkrankung zeigt sich breit angelegt und umfasst verschiedene Krankheitsverläufe, von dem selten auftretenden akut-subakuten Verlauf, über den schubförmigen Krankheitsverlauf, bis zu den primär oder sekundär chronischen MS-Verläufen. Noch ausgeprägter heterogen stellt sich das pathologische Erscheinungsbild der MS-Erkrankung dar [107]. Die klassischen Varianten der MS, wie schubförmige und progrediente Krankheitsverläufe, spiegeln sich in einer großen

neuropathologischen Bandbreite der unterschiedlichen Läsionen wieder [108]. Diese großen Unterschiede in Krankheitsauftreten und Pathologie der MS könnten wiederum auf ganz unterschiedliche immunologischen Mechanismen in der Pathogenese der Erkrankung hindeuten [107]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Analyse der TNF-Rezeptor-Adapterprotein-mRNA aus humanen Leukozyten durch die Untersuchung von drei Gruppen von MS-Patienten mit den unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung, sowie einem gesunden Kontrollkollektiv durchgeführt. Dadurch sollten eventuelle Unterschiede in der Genexpression der interessanten Faktoren im direkten Vergleich der verschiedenen Gruppen besser verdeutlicht und erläutert werden können. Diese könnten ein deutlicher Hinweis auf die unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen der verschiedenen MS-Verlaufsformen sein und somit auch durch die Erweiterung des Krankheitsverständnisses von großer Bedeutung für zukünftige diagnostische und therapeutische Ansätze sein. Darüber hinaus wurde auch eine Verlaufsbeobachtung der Patientengruppe mit RR-MS durchgeführt. Die 12-monatige Untersuchung mit 4 Untersuchungszeitpunkten in dreimonatigen Abständen umfasste die Messung der immunologischen Parameter TRADD und FADD, sowie auch klinische Faktoren wie etwa den EDSS-Wert, welcher den Grad der Behinderung durch die Erkrankung beschreibt. Mögliche zeitliche Veränderungen der interessanten immunologischen Faktoren TRADD und FADD sowie der beschreibenden klinischen Variablen sollte zusätzliche Aufschlüsse über die pathogenetischen Mechanismen der Erkrankung ermöglichen.

Die Ätiologie der MS scheint bis dato noch nicht zur Genüge geklärt. Die Erkrankung scheint jedoch in einer multifaktoriellen Genese begründet zu sein bei der genetische, aber auch Umweltfaktoren eine gewisse Rolle zu spielen scheinen [1;10]. Jedoch konnten im Laufe der Zeit auch einige Besonderheiten im klinischen Auftreten der Erkrankung ermittelt werden. Die unterschiedlichen MS-Verlaufsformen scheinen sich hierbei in der Inzidenz und dem Patientenprofil zu unterscheiden. Die mit 85% am häufigsten diagnostizierte RR-MS-Form scheint dabei vermehrt das weibliche Geschlecht zu betreffen. Die Geschlechterverteilung wird hierbei in der heutigen Literatur mit Frauen : Männern bei 2:1 angegeben. Zudem scheint sich der Erkrankungsbeginn gehäuft im jungen Erwachsenenalter zu manifestieren. Die seltenere PP-MS stellt sich wiederum klinisch ganz anders dar. Die PP-MS tritt häufiger im fortgeschrittenen Alter auf und scheint zudem auch zunehmend bei Männern aufzutreten [109]. Diese genannten Faktoren stellten sich auch in der Struktur der einzelnen Kollektive dar. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit neben den schon beschriebenen

interessierenden immunologischen Parametern auch einige ätiologische Faktoren wie das Alter der Probanden oder die Geschlechtsverhältnisse innerhalb der einzelnen Gruppen bestimmt. So konnten die einzelnen Kollektive auch in ihrem Aufbau miteinander verglichen werden, womit eine komparative Diskussion der interessierenden Parameter TRADD und FADD möglich wurde.

Die MS zeigt sich jedoch nicht nur hinsichtlich des Manifestationsalters oder der Geschlechtsverteilung innerhalb ihrer verschiedenen Verlaufsformen sehr heterogen. Auch das klinische Erscheinungsbild dieser Krankheit weist sowohl anhand der Verlaufsformen, aber auch inter- und intraindividuell eine große Bandbreite auf. Aus dem dargestellten Grund wurden die Gruppen der an MS erkrankten Patienten zusätzlich in dieser Arbeit im Hinblick auf einige krankheitsspezifische Faktoren untersucht und anhand dieser miteinander verglichen. Dabei wurden bei den Patienten die Dauer der MS-Erkrankung, der EDSS zu Beginn der Untersuchung, der Progressionsindex der Erkrankung (EDSS/Krankheitsdauer) als Merkmal für das Krankheitsfortschreiten, sowie die Anzahl an Erkrankungsschüben während der Untersuchung bestimmt. Zur Bestimmung des durch die MS-Erkrankung hervorgerufenen Behinderungsgrades wurde die Einteilung durch den EDSS nach J.F. Kurzke angewendet [110]. Durch die Erfassung dieser klinischen Einflussfaktoren konnten die drei unterschiedlichen Erkranktenkollektive klinisch direkt gegeneinander abgegrenzt werden. Damit wurde letztendlich anhand der untersuchten Kollektive ein Vergleich dieser Gruppen unterschiedlicher Verlaufsformen durchgeführt. Diese Vergleiche schafften hierbei eine wichtige Basis für die Diskussion über mögliche Unterschiede in der Genexpression der beiden untersuchten Adapterproteine FADD und TRADD. Darüber hinaus könnten durch die Vergleiche der drei Gruppen untereinander auch eventuelle Rückschlüsse auf Unterschiede in den pathologischen Mechanismen bei unterschiedlichen Verlaufsformen der MS gezogen werden.

Die klinische Ausprägung der MS kann auch intraindividuell stark variieren. Dabei kann sich sowohl die Krankheitsaktivität, als auch die klinische Symptomatik im Sinne neurologischer Defizite im Verlauf der Erkrankung bei einem individuellen Patienten stark verändern. Dieser Wandel kann sich dabei überaus akut und plötzlich wie etwa bei einem Krankheitsschub der RR-MS-Verlaufsform, aber auch langsam steigend wie bei den primär und sekundär chronischen Verlaufsformen, abspielen. Weiterhin kann es auch zu einem Rückgang neurologischer Einschränkungen, beispielsweise während der Schubremission kommen. Die Veränderungen der Krankheitsaktivität scheinen sich auch in dem pathologischen Bild der Erkrankung auszuwirken. So gibt es deutliche Unterschiede im histopathologischen Auftreten

zwischen den jeweiligen Erkrankungsformen in akuten und chronischen Krankheitsstadien. Demnach gibt es auch Hinweise, dass den verschiedenen Krankheitsverläufen unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zugrunde liegen. Diese Mechanismen könnten demnach auch auf der immunopathogenetischen Ebene ablaufen. Um diese Fragestellung zu diskutieren wurde auch eine Verlaufsuntersuchung der Kollektivgruppe der RR-MS-Patienten im Zeitraum von 12 Monaten mit 4 Untersuchungszeitpunkten durchgeführt.

Es konnte in einer Reihe von Untersuchungen dargestellt werden, dass  $\text{TNF}\alpha$  eine tragende Rolle in dem Erkrankungsgeschehen der Multiplen Sklerose zu spielen scheint [41-43]. Bereits vor 20 Jahren konnte die Forschungsgruppe um Hofman anhand der Untersuchung von Obduktionspräparaten das Auftreten des Zytokins innerhalb aktiver MS-Entmarkungsherde in Gehirnen verstorbener an MS erkrankter Personen beschreiben [47]. Später konnten durch mehrere Gruppen auch erhöhte Werte des  $\text{TNF}\alpha$  in Serum und Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden [42;48]. Dabei gelang es auch relevante Zusammenhänge zwischen den erhöhten Zytokinspiegeln in Serum und Liquor der an MS erkrankten Personen und der Progression der ZNS-Erkrankung nachzuweisen [50;51]. Wenige Jahre später konnte demonstriert werden, dass bereits 2 bis 6 Wochen vor einer klinischen Manifestation eines akuten Erkrankungsschubes der MS ein Anstieg der mRNA-Konzentration des  $\text{TNF}\alpha$  in mononukleären Zellen im peripheren Blut der MS-Erkrankten mit einer RR-MS-Verlaufsform stattfindet [52]. Zudem konnte die Arbeitsgruppe um Rieckmann nachweisen, dass bei Patienten mit einem aktiven Krankheitsverlauf im Vergleich zu MS-Patienten mit einem stabilen Erkrankungsverlauf oder gesunden Kontrollprobanden die  $\text{TNF}$ -mRNA von den mononukleären Zellen des Immunsystems auf einem grundsätzlich höheren Niveau exprimiert wird [52;53]. Zudem wurde auch die Rolle des Zytokins in der Immunopathogenese der Erkrankung untersucht.  $\text{TNF}\alpha$  scheint eine unmittelbare Effektor-Funktion sowohl im experimentell erzeugten, als auch im tatsächlichen humanen Demyelinisierungsgeschehen einzunehmen [44-46;49]. Weiterhin konnte anhand von in vitro-Studien eine direkte zytotoxische Wirkung auf Oligodendrozyten, sowie eine proliferationsfördernde Wirkung des Zytokins auf Astrozyten aufgezeigt werden [49]. Neben der direkten Wirkung und Bedeutung des Zytokins in der Immunopathogenese der MS wurden auch die durch das  $\text{TNF}$  beschrittenen Signalwege im Kontext der Erkrankungsentstehung zumindest partiell untersucht und beleuchtet. So fanden beispielsweise die Forschungsgruppe um Martino Veränderungen im Genexpressionsniveau der beiden  $\text{TNF}$ -Rezeptoren  $\text{TNF-R1}$  und  $\text{TNF-R2}$  bei RR-MS-Patienten [54]. Dieser

Sachverhalt wurde in den darauf folgenden Jahren in zahlreichen Studien detailliert beleuchtet. Dabei konnten jedoch von verschiedenen Gruppen teilweise recht unterschiedliche Ergebnisse erhoben werden. So konnte einerseits während der akuten Krankheitsschübe eine Erhöhung des löslichen TNF-R1-Levels im Serum und Liquor von MS-Patienten ermittelt werden [55;56]. In weiteren Folgestudien konnten andererseits diese Ergebnisse jedoch nicht mehr bestätigt werden oder ergaben kontroverse Daten [53;57-59]. Auch die Untersuchungen der Genexpression des TNF-R2 ergaben deutlich differierende Daten. So konnte die Gruppe um Martino bei der Untersuchung der Expression des löslichen TNF-R2 (sTNF-R2) keine Unterschiede im Vergleich von RR-MS-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe ermitteln [54]. In aktuelleren Studien konnte wiederum eine signifikante Erhöhung der Ausschüttung des sTNF-R2 bei an MS erkrankten Untersuchungspersonen gegenüber gesunden Kontrollprobanden ermittelt werden [57].

## **4.2 Betrachtung der 4 Kollektive**

### **4.2.1 Betrachtung der Kollektive in Hinsicht auf Alter und Geschlecht**

#### ***Geschlecht***

Zunächst wurden die untersuchten Kollektive anhand der Alters- sowie der Geschlechtsverteilung miteinander verglichen. Hinsichtlich der Geschlechtsverteilung zeigte sich deutlich ein Überwiegen des weiblichen Geschlechts im Gesundenkollektiv wie auch den beiden Gruppen von Patienten mit RR-MS und SP-MS. Lediglich in der Gruppe der PP-MS-Erkrankten lag das Geschlechterverhältnis zugunsten der männlichen Probanden. Noch deutlicher konnte diese Differenz bei der statistischen Betrachtung der MS-Kollektive veranschaulicht werden. Diese Unterschiede spiegeln hierbei die bereits in reichlichen Untersuchungen festgestellte Geschlechtsverteilung bei den unterschiedlichen Varianten der demyelinisierenden Erkrankung wieder. So manifestiert sich die häufigste Subform mit schubförmigem Auftreten der Krankheitssymptome häufiger bei Frauen als bei Männern [111]. Im Gegensatz dazu tritt die wesentlich seltenere Erkrankungsform mit erstrangig fortschreitender Krankheitsaktivität gehäuft bei Männern auf [1].

#### ***Alter***

Auch die Altersverteilung innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen wurde näher beleuchtet. Es stellte sich dabei heraus, dass sich die einzelnen Untersuchungsgruppen der

Gesundenpopulation, der Erkrankten mit RR-MS und SP-MS in der Altersverteilung in großen Teilen ähnelten. Einzig die Gruppe der MS-Patientin mit der PP-MS-Form sticht durch ein höheres mittleres Alter heraus. Auch dieser Unterschied in der Verteilung lässt sich in reichlich Literatur wiederfinden [1;109]. So zeichnet sich die von Beginn an progressiv verlaufende Form der MS durch einen späteren Erkrankungsbeginn gegenüber der schubförmigen-MS und der sekundär fortschreitenden MS aus [111].

#### **4.2.2 Betrachtung der Kollektive in Hinsicht auf TRADD**

Schließlich wurden die jeweiligen Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Genexpression des TNF-R1-assoziierten Proteins TRADD untersucht und miteinander verglichen. Hierzu wurden zuerst alle Kollektive im Gesamten betrachtet. Darauf folgend wurde nun die Genexpression von TRADD nur in den Kollektiven der MS-Erkrankten verglichen. Zum Schluss wurde diese auch noch auf Veränderungen im Verlauf von einem Jahr im Kollektiv der Patienten mit schubförmiger MS untersucht. Bei dieser ausführlichen Untersuchung der Genexpression zeigte sich, dass kein deutlicher Unterschied in der Genexpression dieses Proteins zwischen den einzelnen Gruppen bestand. Weder durch den Vergleich der MS-Erkrankten mit gesunden Probanden, noch zwischen den verschiedenen MS-Gruppen konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Auch die Untersuchung der Genexpression von TRADD bei RR-MS-Patienten im Ablauf von einem Jahr ergab keinen Hinweis auf eine deutliche Änderung des Parameters in dieser Zeit. Demnach scheint die Genexpression von TRADD bei gesunden Personen und MS-Erkrankten gleich auszufallen, und auch keiner besonderen zeitlichen Änderung zu unterliegen. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits bei Untersuchungen von „Death receptors“ in Kollektiven von Gesunden und an MS erkrankten Personen aufgefunden werden. So konnte unter anderem nicht nachgewiesen werden, dass diese Art von Rezeptoren eine signifikante Rolle für den durch Apoptose induzierten Verlust an neuronalen Zellen in MS-Läsionen im ZNS spielte [112]. Auch in früheren Studien konnten bereits Ergebnisse erzielt werden, welche diese Erkenntnis unterstreichen. So konnte festgestellt werden, dass sich das Niveau von gelöstem TNF-R1 im Serum von RR-MS-Patienten im akuten Krankheitsschub nicht wesentlich von dem gesunder Probanden, oder Patienten mit RR-MS in der schubfreien Phase unterschied [58]. Diese Feststellung konnte auch auf der Ebene der Genexpression dargestellt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression von TNF-R1-mRNA zwischen Patienten mit RR-MS und Gesunden bestand. In der gleichen Studie wurde aber auch deutlich, dass die Genexpression



dieses speziellen Proteins in zeitlicher Korrelation zu einer bevorstehenden Schubaktivität stand [54].

TRADD ist ein multifunktionales Adapterprotein welches durch Ligandenbindung dem TNF-R1 angegliedert ist [113]. Es beinhaltet zwei separate Bereiche durch deren Bindung mit verschiedenen Partnerproteinen unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Signalwege eingeschlagen werden können [77]. Somit scheint sich die Bifurkationstelle zwischen den beiden Signaltasduktionswegen Inflammation und Apoptose, bei TRADD zu finden [77]. Zudem scheint TRADD die entscheidende Signaladapterstelle zu sein, welche sämtliche intrazellulären Antworten des TNF-R1 verschaltet [114]. Dem zufolge könnte daraus geschlossen werden, dass TRADD kongruent dem TNF-R1 verhält, da das Adapterprotein dem Rezeptor direkt angebunden ist. So könnte dies in Zusammenhang mit den Daten zur mRNA-Expression der TNF-Rezeptoren anderer MS-Gruppen die fehlenden Unterschiede in der Genexpression der TRADD-mRNA erklären. Diese Sachlage ist jedoch noch nicht zur Genüge untersucht.

Zahlreiche Untersuchungen zu der Bedeutung der TNF-Rezeptor-Signalwege in der Pathogenese der MS zeigen nicht eindeutige, sondern teils konträre Ergebnisse [54].

#### **4.2.3 Betrachtung der Kollektive in Hinblick auf FADD**

Auch die Genexpression des Adapterproteins FADD wurde innerhalb der Gruppen von MS-Patienten unterschiedlicher Krankheitsverläufe und bei gesunden Probanden untersucht und verglichen. Wie auch schon zuvor beschrieben, wurden daraufhin die Erkranktengruppen im Einzelnen und zudem die Gruppe der RR-MS-Patienten im Speziellen im Verlauf untersucht. Hierbei ergab sich das Ergebnis, dass es Unterschiede in der Genexpression der mRNS des Proteins FADD zwischen den verschiedenen Gruppen gab. So ergab sich der Hinweis, dass in der Gruppe der RR-MS-Patienten die Proteinexpression von FADD stärker ausgeprägt zu sein schien als in den übrigen untersuchten Gruppen. In der Verlaufsbeobachtung konnten keine Hinweise auf eine Beeinflussung des Parameters im zeitlichen Verlauf, oder durch klinische Parameter wie den Wert der Behinderungsskala nachgewiesen werden. Die Genexpression des Adapterproteins scheint sich hierbei im Ablauf von einem Jahr in dieser Gruppe der schubförmigen MS nicht zu verändern.

FADD ist ein zytoplasmatisches Adaptermolekül, welches mit einer Reihe von „Death“-Rezeptoren interagieren kann und über Kaspase-Aktivierung die Apoptose induzieren kann [115]. Diese „death receptors“ gehören zu einer Subfamilie der TNF-Rezeptor-Gruppe.

Manche Mitglieder dieser Familie, wie CD95 oder DR4 und DR5 gehen direkt Bindungen mit FADD ein. Andere wiederum, wie der schon ausführlich besprochene TNF-R1 interagieren mit diesem Protein über weitere Adapterproteine, so zum Beispiel TRADD [116;117]. Charakteristisch für diese Rezeptorenfamilie sind die innerhalb ihrer intrazellulären Bereiche enthaltenen DD. Diese Bereiche werden für die Einleitung des induzierten Zelltodes benötigt. Das Protein FADD scheint dabei der universale Adapter dieser Rezeptoren zu sein, um diesen Weg durch Aktivierung von Caspase 8 einzuschlagen [118].

So konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Überexpression dieses Proteins zu einem erhöhten Apoptosegeschehen in Zellen führen konnte [119]. So scheint die übermäßige Expression von FADD eine chemotherapeutisch induzierte Apoptose in kolorektalen Karzinomzellen zu verstärken [120]. Zudem konnte eine Beteiligung des Proteins FADD an zahlreichen Erkrankungen aufgezeigt werden. So scheint das Protein in einer Interaktion mit Caspase 8 maßgeblich an neurodegenerativen Prozessen bei Morbus Parkinson beteiligt zu sein [121]. Jedoch konnten in neueren Studien, neben dieser scheinbar hauptsächlichen physiologischen Funktion, auch zahlreiche non-apoptotische Aktivitäten diesem Protein zugeschrieben werden [117]. So wurde auch die Beteiligung von FADD an Prozessen der Embryogenese, der Hämatopoese, oder der angeborenen Immunabwehr aufgedeckt [122]. In diesem speziellen Zusammenhang konnte bereits vor 10 Jahren die besondere Bedeutung von FADD in der Entwicklung und Aktivierung von T-Lymphozyten dargestellt werden. In dieser Untersuchung konnte bereits verdeutlicht werden, dass es in Bezug auf T-Zell-Funktion auch andere Signalwege als die bekannte Aktivierung von Caspase 8 und damit Apoptose geben musste [115]. Diese These zeichnet sich nun auch in neueren Studien ab. So scheint das Protein FADD in phosphorylierter Form (pFADD), einer besonderen chemischen Modifikation seiner Struktur, speziell für die non-apoptotische Aktivität innerhalb der Zellproliferation verantwortlich zu sein [116;122]. Dieser durch FADD vermittelte „nicht-apoptotische“ Signalweg ist jedoch bisweilen nur wenig untersucht und scheint kaum verstanden zu sein [123]. Hinsichtlich der pathologischen Wirkweise zeigten neuere Untersuchungen eine Beteiligung dieses Proteins im Verlauf maligner Erkrankungen. So korrelierten hohe Expressionsraten dieses Proteins in seiner phosphorylierten Form mit einer reduzierten Überlebensrate bei Lungen- und Prostatakarzinomen. Bei dem Ösophaguskarzinom konnte ebenfalls eine Überexpression von pFADD festgestellt werden [124]. Das Auftreten und Verhalten des Proteins FADD wurde bis dato noch nicht in Hinblick auf die MS untersucht. Demnach lassen sowohl die noch nicht gänzlich verstandene Funktion und Signalwege des Proteins, als auch die Rolle in der MS-Pathogenese zunächst

nur Mutmaßungen zu. Nichtsdestotrotz könnten sich diese Erkenntnisse besonders in Hinblick auf das derzeitige Verständnis der immunologischen Hintergründe der MS als interessant erweisen. Wie bereits ausführlich behandelt, scheint ein Faktor der Pathogenese dieser Erkrankung das verstärkte Auftreten autoreaktiver T-Lymphozyten zu sein [43]. Die in dieser Dissertationsarbeit nachgewiesene erhöhte Expression des Proteins FADD bei Leukozyten von MS-Patienten der RR-MS-Gruppe gegenüber den restlichen Probanden könnte ein Hinweis für die Beteiligung dieses Proteins an der Pathogenese sein. Der Unterschied zwischen den Erkranktenkollektiven könnte dabei wiederum ein Indiz auf den derzeit angenommenen unterschiedlichen pathogenetischen Hintergrund der verschiedenen Krankheitsformen sein. Hierbei könnte eine Differenzierung der untersuchten Leukozyten in die einzelnen Untergruppen und die Untersuchung der Transkription von FADD in den jeweiligen Subpopulationen eine weitere interessante Fragestellung darstellen, um die Pathogenese der MS zu untersuchen.

### **4.3 Betrachtung der MS-Kollektive**

#### **4.3.1 Betrachtung der MS-Kollektive im Hinblick auf die Krankheitsdauer**

Vorerst wurden die drei Gruppen der MS-Erkrankten anhand der Dauer der Krankheit mit einander verglichen. Die Krankheitsdauer umfasste dabei den Zeitraum zwischen der Erstdiagnose der Erkrankung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Im direkten Vergleich der drei Gruppen konnte hierbei kein Unterschied innerhalb der Fraktionen festgestellt werden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die drei MS-Kollektive bezüglich der Dauer der MS-Erkrankung gleichartig aufgebaut sind.

#### **4.3.2 Betrachtung der MS-Kollektive im Hinblick auf den EDSS**

Weiterhin wurden die Kollektive der MS-Patienten anhand des EDSS miteinander verglichen. Wie schon im einleitenden Abschnitt dieser Arbeit erläutert, wird dieser häufig als Maßeinheit eingesetzt, um den Grad der Behinderung des aktuellen Erkrankungsabschnittes einzuschätzen [29]. Bei der Gegenüberstellung der betrachteten Gruppen wurde offensichtlich, dass ein klarer Unterschied zwischen den Kollektiven bestand. Der durchschnittliche EDSS-Wert der Patienten mit RR-MS war deutlich geringer als in den beiden anderen Gruppen. Dieser Unterschied war begründet in den unterschiedlichen Verlaufsformen der MS. Behinderungen im Verlauf der Erkrankung entstehen primär nicht aufgrund der

Krankheitsschübe sondern vielmehr im Wesentlichen durch chronisches Fortschreiten des entzündlichen Geschehens [1]. Bei der PP-MS wie auch bei SP-MS bestimmt das kontinuierliche Fortschreiten den Erkrankungsverlauf. Folglich ist der Grad der Behinderung bei diesen Auftrittsformen der Erkrankung stärker ausgeprägt als bei der MS mit klinisch rein schubförmigem Auftreten. Es war also zu erwarten, dass der nach klinischen Kriterien festgelegte EDSS in der Gruppe mit RR-MS geringere Werte einnahm, als in den beiden Gruppen mit chronischer MS, was die vorliegenden Daten auch zeigen.

#### **4.3.3 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf den Progressionsindex**

Als weitere MS-spezifische Variable wurde der Progressionsindex der Erkrankung in den unterschiedlichen MS-Gruppen beurteilt. Dieser Parameter bezeichnet das Verhältnis des EDSS-Wertes zu der jeweiligen Dauer der Erkrankung. Der Progressionsindex ist folglich eine Variable, welche den klinischen Verlauf und das Fortschreiten der MS beschreiben kann. Im Vergleich der drei Erkrankten-Kollektive zeigte sich, dass wiederum ein deutlicher Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten mit RR-MS und den beiden Gruppen der Patienten mit chronisch fortschreitendem Krankheitsverlauf bestand. Da sich, wie bereits beschrieben, die Kollektive in Hinblick auf die Dauer der Erkrankung nicht unterschieden, jedoch deutliche Differenzen in Bezug auf den EDSS aufwiesen, kann daraus geschlossen werden, dass sich diese Unterschiede auch im Progressionsindex widerspiegeln. Dies kann vor allem durch die Beobachtungen unterstrichen werden, dass bei RR-MS zwar in bestimmten Zeitabständen Erkrankungsschübe mit den daraus folgenden Defiziten auftreten, diese aber wieder sukzessiv zur Teil-Remission führen [1]. Bei den progredienten Formen der MS hingegen kommt es jedoch zu einem irreversiblen Fortschreiten der Behinderung [125].

#### **4.3.4 Betrachtung der MS-Kollektive in Hinsicht auf die Schubanzahl**

Zuletzt wurden die MS-Kollektive anhand der Anzahl an Schüben innerhalb der Gruppen verglichen. Es zeigt sich sehr deutlich, dass sich in diesem Zusammenhang die Gruppe der Patienten mit RR-MS stark von der Gruppe der SP- und der PP-MS-Patienten unterschied. In der ersten Gruppe konnten Krankheitsschübe bei wenigen Probanden innerhalb des Beobachtungszeitraumes festgestellt werden. Im SP-Kollektiv trat nur ein MS-Schub auf. Im Gegensatz dazu trat bei der PP-MS-Gruppe keinerlei Schubaktivität auf. Diese Beobachtung spiegelt ebenfalls gut die unterschiedlichen Krankheitsformen der MS wieder. Es wird somit

klar, dass diese Erkrankung große interindividuelle Unterschiede bezüglich der Klinik und des Schweregrads aufweist. Diese scheinen sich auch auf der pathophysiologischen Ebene wiederzuspiegeln [8].

Es muss jedoch auch deutlich gemacht werden, dass unabhängig von dem klinischen Auftreten der Erkrankungsformen, das Studiendesign Schübe in geringen zeitlichen Abständen zu den Messzeitpunkten ausschloss. Dies sollte verfälschende Messungen der beobachteten Parameter aufgrund akut erhöhter entzündlicher Aktivität verhindern. Die Situation im akuten Schub wurde isoliert im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

#### **4.4 Betrachtung des RR-Kollektivs im Verlauf**

Neben den dargestellten Untersuchungen zu einem einzigen bestimmten Zeitpunkt wurde das Kollektiv der RR-MS-Patienten einer Verlaufsuntersuchung unterzogen. Diese Beobachtung verlief über 4 Messzeitpunkte in Abstand von etwa 3 Monaten über insgesamt 1 Jahr. Die Untersuchung beinhaltete die Beobachtung des EDSS-Werts im Verlauf von einem Jahr, sowie die Untersuchung der interessanten Variablen TRADD und FADD bei dieser speziellen Gruppe. Da jedoch zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung nur noch ein gewisser Anteil der ursprünglichen Probanden zur Verfügung stand, wurde der Langzeitverlauf mit zwei getrennten Auswertungen untersucht. Dabei wurde zum einen das komplette Kollektiv anhand der ersten drei Zeitpunkte, zum anderen der gesamte Untersuchungszeitraum mit einer auf 15 Probanden reduzierten Kollektivgröße verglichen.

##### **4.4.1 Verlaufsbeobachtung des RR-Kollektivs in Hinsicht auf den EDSS**

Zunächst wurde der schon in den vorhergehenden Abschnitten ausführlich erläuterte Parameter des EDSS untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieser Wert während des verkürzten Beobachtungszeitraums im Gesamtkollektiv keiner Veränderung unterlag. Wurde jedoch der komplette Ablauf von einem Jahr, wenn auch an einer reduzierten Probandenanzahl betrachtet, konnte eine geringe Zunahme des Behinderungsgrades wahrgenommen werden. Diese differenten Ergebnisse können als Hinweis darauf gedeutet werden, dass es im Laufe der schubförmigen Erkrankung nur langsam zu einer Verschlechterung der physischen Fähigkeiten kommt. Diese Beobachtung kann auch anhand reichlicher wissenschaftlicher Darstellungen dieses Erkrankungstyps der MS bestätigt werden [1].

#### 4.4.2 Verlaufsbetrachtung des RR-Kollektives in Hinsicht auf TRADD und FADD

Zuletzt wurde in einer Langzeitstudie das Kollektiv der Patienten mit schubförmiger MS auf eine mögliche Veränderung der Genexpression der beiden Parameter TRADD und FADD untersucht. So könnte eine Änderung in der Genexpression Schlüsse auf die pathogenetische Bedeutung der Adapterproteine bei schubförmiger MS ermöglichen. Hierbei wäre eine Veränderung der Variablen in Bezug auf erhöhte Krankheitsaktivität oder Zunahme der neurologischen Defizite besonders interessant erscheinend. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Genexpression beider Adapterproteine im Verlauf von 12 Monaten konstant blieb und sich keine Hinweise auf eine Zu- oder Abnahme der Genexpression dieser Parameter ergab.

Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte durch die Berücksichtigung mehrerer Faktoren erbracht werden. Zum einen, betrachtet man das Kollektiv in Hinblick auf Änderung des EDSS, lässt sich allenfalls nur ein sehr geringer Zuwachs dieser klinischen Größe vermerken. Somit kam es also innerhalb des Untersuchungsjahres zu keiner bedeutsamen Zunahme des klinischen Behinderungsgrades. Zum einen spiegelt dieser Sachverhalt und somit die spezielle Patientengruppe den charakteristischen Krankheitsverlauf einer schubförmigen MS mit wiederkehrenden Krankheitsepisoden mit Remissionen und Intervallen unauffälliger neurologischer Fähigkeiten wieder [1]. Zum anderen aber impliziert das Studiendesign eine geringe Schubaktivität und somit auch eine verminderte Veränderung der neurologischen Einschränkungen durch die Auswahl der Probanden in Hinblick auf die Untersuchungszeitpunkte und die aktuelle Schubaktivität.

Die Signalwege der TNF-Rezeptoren und Veränderungen ihrer assoziierten Adapterproteine werden seit geraumer Zeit in Verbindung mit krankhaften Veränderungen des Immunsystems gebracht [89;106;126]. Beispielsweise werden die TNF-Rezeptoren als entscheidende Mediatoren der EAE, welche als künstliches Modell der MS gilt, bezeichnet [62]. Auch den Adapterproteinen, wie bereits ausführlich erläutert, werden wichtige Rollen im immunphysiologischen Geschehen zugestanden. So wird unter anderem dem Adapterprotein FADD eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Krebserkrankungen, wie zum Beispiel dem Nierenzellkarzinom zugesprochen [127]. Da aber bereits in der Darstellung des Grades einer neurologischen Einschränkung keine merkliche Veränderung innerhalb der untersuchten 12 Monate bei den Patienten auftrat, könnte die Konstanz der beiden anderen Laborparameter als subklinische Bestätigung des gleichbleibenden Krankheitsgeschehens interpretiert werden. Die Beständigkeit der Adapterproteine könnte also eine Widerspiegelung des klinischen Parameters auf molekularer Ebene darstellen. Dies eröffnet wiederum die Frage, wie und ob

sich die Transkription des Proteins FADD mit Ansteigen des EDSS-Wertes und somit dem Fortschreiten der Erkrankung verändert. Diese interessante Fragestellung könnte beispielsweise anhand von Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen und einem längerem Untersuchungszeitraum erörtert werden.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

In vorliegender Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Genexpression des TNF-Rezeptor-1 angegliederten Adapterproteines FADD bei Patienten mit RR-MS im Vergleich zu Gesunden, sowie auch Patienten mit anderen MS-Formen erhöht zu sein scheint. Diese Veränderung scheint hierbei zeitlich relativ konstant zu sein, da in der anschließenden Verlaufsbeobachtung innerhalb eines Jahres keine Veränderung des genannten Parameters festgestellt werden konnte.

Das Protein FADD spielt zum einen eine wesentliche Rolle im Ablauf von Apoptose [119]. Durch diese Funktion scheint FADD maßgeblich am Entstehen zahlreicher maligner Erkrankungen beteiligt zu sein [120]. Zudem spielt FADD eine signifikante Rolle in der Entwicklung und Aktivierung von T-Zellen und somit auch der Kaskade des Immunsystems [115]. Neuerdings wird dem Adapterprotein neben der proapoptotischen auch eine proliferative Signalwirkung zugesprochen. Dieser gegensätzliche Signalweg und seine wichtige Rolle für die Lymphozyten-Entwicklung und -Proliferation scheint jedoch bis dato noch nicht hinreichend verstanden [123]. Die Bedeutung der Adapterproteine im pathophysiologischen Geschehen der MS ist nach aktueller Studienlage noch nicht weitreichend untersucht. Jedoch konnte die Beteiligung der, den Adapterproteinen vorangestellten TNF-Rezeptoren im Erkrankungsgeschehen der MS bisher anhand mehreren Studien nachgewiesen werden [56;57;128]. Zudem konnte FADD eine Rolle bei neurodegenerativen Prozessen zugeschrieben werden [121]. Die erstmals in dieser Arbeit dargestellte verstärkte Expression des Proteines FADD bei RR-MS-Patienten könnte also auf die Beteiligung des Adapterproteins am immunologischen und pathophysiologischen Geschehen der MS vom RR-Typ hinweisen. Die konstante Veränderung der Genexpression des untersuchten Proteins gegenüber gesunden Probanden aber auch Probanden, welche an anderen Formen der MS erkrankt waren, könnte dabei auf eine differente Pathogenese der verschiedenen Krankheitsformen hinweisen.

Mit dieser Untersuchung eröffnet sich somit ein breites Feld weiterer interessanter Fragen und Untersuchungsmöglichkeiten. So stellt sich die Frage, wie sich die Parameter im oder

unmittelbar vor einem akutem Krankheitsschub verhalten. Auch Veränderungen dieser Parameter im weiteren Verlauf des chronischen Stadiums der MS scheinen äußerst interessant zu sein. Zudem könnte eine Untersuchung welche unter der Behandlung mit Immunmodulatoren oder Chemotherapeutika stehen, die Patienten mit Unbehandelten vergleicht besonders interessante Ergebnisse erbringen. Weiterhin könnte auf immunologischer Ebene die Differenzierung der Leukozyten in Ihre Subgruppen und die Untersuchung der Transkription der beiden Proteine in diesen sehr interessant erscheinen.

Hieraus ergeben sich also zahlreiche Fragen, welche es zu erforschen lohnt, um die bisher noch nicht hinreichend geklärten Zusammenhänge der Rolle der TNF-Rezeptor-Liganden in der Pathophysiologie der MS deutlich zu machen.



## 5 Zusammenfassung

Die MS stellt mit weltweit ca. 2,5 Millionen Erkrankten eine der häufigsten chronisch entzündlichen Erkrankung des Zentralen Nervensystems im jungen und mittleren Erwachsenenalter dar. Die Gründe für die Entstehung dieser Krankheit scheinen immer noch nicht gänzlich verstanden und sind Gegenstand der pathophysiologischen, immunologischen und neurologischen Forschung. Einen wichtigen Aspekt scheint hierbei das neuroimmunologische Geschehen einzunehmen. Die Rezeptoren des Zytokins TNF $\alpha$  sind in der Weichenstellung zwischen proinflammatorischen und apoptotischen Signalwegen von Bedeutung.

Ziel dieser Grundlagen orientierten Arbeit mit einem explorativen Design war es, durch die Untersuchung der Korrelation der TNF-Rezeptor-assoziierten Proteine TRADD und FADD in Abhängigkeit von verschiedenen klinischen Variablen zu beleuchten, ob eine Bedeutung dieser bestimmten Proteine in der Pathogenese der MS vorliegt. Damit sollten neue Erkenntnisse über die Bedeutung der TNF-Rezeptoren für die Immunologie der MS in ihren zahlreichen Verlaufsformen erlangt und somit eine Grundlage für die Fragestellung eines therapeutischen Nutzens der genannten Proteine bei der MS geschaffen werden.

Hierfür wurde im ersten Teil der Arbeit die Methode der Real-time RT-PCR für die genannten Proteine in mehreren Schritten etabliert und optimiert.

Im zweiten Schritt wurden die neu etablierten PCR-Methoden angewendet, um die Expression der beiden an der Signaltransduktion der TNF-Rezeptoren beteiligten Adapter-Proteine TRADD und FADD in den verschiedenen Verlaufsformen der MS zu untersuchen. Das ausgesuchte Kollektiv bestand aus MS-Patienten, welche in drei Gruppen der verschiedenen MS-Verlaufsformen unterteilt wurden und gesunden Probanden.

Dabei konnte dargestellt werden, dass die Genexpression von TRADD keine wesentlichen Unterschiede sowohl zwischen Gesunden und MS-Erkrankten, als auch innerhalb der verschiedenen MS-Gruppen aufwies. Auch im Verlauf von einem Untersuchungsjahr konnte keine Veränderung dieses Parameters bei Patienten mit RR-MS festgestellt werden. Bei der Untersuchung des Proteins FADD jedoch konnte erstmals gezeigt werden, dass die Genexpression bei MS-Patienten mit schubförmigem Verlauf im Vergleich mit den anderen Gruppen erhöht war. Zudem konnte in der anschließenden Verlaufsbeobachtung dargestellt werden, dass sich dieser Unterschied im Verlauf eines Jahres nicht veränderte.

Die Beteiligung der TNF-Rezeptoren im Erkrankungsgeschehen der MS konnte bisher anhand mehrerer Studien demonstriert werden. Die Bedeutung ihrer Adapterproteine im

pathophysiologischen Geschehen der MS ist nach aktueller Studienlage noch nicht ausreichend untersucht. Das Protein FADD spielt bekannterweise eine tragende Rolle in der Induktion des Apoptosegeschehens. Nach jüngeren Erkenntnissen scheint es aber auch proliferativ, also antiapoptotisch wirksam zu sein. Somit kann die konstant erhöhte Genexpression des Proteins bei Patienten mit RR-MS im Vergleich zu Gesunden und anderen MS-Formen auf die Beteiligung dieses Adapterproteins am Erkrankungsgeschehen der schubförmigen MS hinweisen.

Aus dieser interessanten Erkenntnis ergibt sich eine Anzahl neuer Fragestellungen und Untersuchungsmöglichkeiten. So zum Beispiel könnte die Veränderung dieser Parameter im akuten MS-Schub oder im Verlauf bei anderen MS-Formen näher erforscht werden. Auch eine Analyse der genannten Parameter bei immunmodulatorisch oder chemotherapeutisch behandelten Patienten und die daraus eventuell resultierende Möglichkeit die genannten Proteine als therapeutisches Target einzusetzen, könnte eine sehr interessante Untersuchung darstellen.

## 6 Summary

MS is one of the most common chronic inflammatory diseases of young and middle-age adulthood. More than 2.5 million patients are affected worldwide.

The etiologic factors of this disease remain poorly understood and continue to be part of pathophysiologic, immunologic and neurologic research. Neuroimmunologic processes appear to be of central importance, including cytokine TNF $\alpha$  receptors. These receptors play a vital role in the balance between proinflammatory and apoptotic pathways.

The goal of this basic science study was to explore the importance of TNF-receptor associated proteins TRADD and FADD on the pathogenesis of multiple sclerosis. Utilizing an explorative design, different clinical variables were examined. With this study, one gains new insights into the importance of the TNF-receptor in the immunology of MS and its numerous clinical courses. It also creates a basis for further questions regarding potential therapeutical aspects of the mentioned proteins in MS.

In the first step of this thesis, the methods for real-time RT-PCR analysis of both proteins were established and optimized.

In a second step, these methods were utilized to examine the expression of TNF-receptor associated adaptor-proteins TRADD and FADD in different clinical courses of MS. The study population consisted of MS patients, who were divided into three groups according to their disease course, as well as healthy volunteers.

Hereby it could be shown, that there were no significant differences in TRADD gene expression between healthy subjects and MS-patients, as well as in between the different groups of MS. Furthermore, additional measurements over the course of one year showed no differences in TRADD-expression within the group of patients suffering from relapsing MS.

The examination of the second protein however, showed that the expression of FADD was elevated in patients with RR-MS in comparison to the other groups. This difference remained constant within the year of follow-up testing.

The relevance of TNF-receptors in the pathogenesis of MS has been demonstrated in multiple studies so far. The importance of its adaptor-proteins in the pathophysiological course of the disease remains unclear. The protein FADD plays a known and important role in the induction of apoptosis. According to latest research, it seems to have proliferative and thus antiapoptotic qualities as well. Therefore the constantly elevated expression of the protein in patients suffering from RR-MS compared to other forms of MS and healthy subjects, could point to a

possible participation of the adaptor-protein in the pathophysiological events leading to relapsing MS.

This interesting fact leads to numerous new questions and possible further studies. For instance, changes in this parameter during an acute MS exacerbation or in the course of other forms of MS could be further examined. Additionally, analysis of these parameters in patients undergoing immune modulation or chemotherapy may help isolate these proteins as targets for new forms of treatment.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; **52**: 61-76.
2. Greenstein JI. Current concepts of the cellular and molecular pathophysiology of multiple sclerosis. *Dev.Neurobiol.* 2007; **67**: 1248-65.
3. Hickey WF. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J.Neuroimmunol.* 1999; **98**: 37-44.
4. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu.Rev.Neurosci.* 2008; **31**: 247-69.
5. Prineas J. Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. *Hum.Pathol.* 1975; **6**: 531-54.
6. Prineas JW, Raine CS. Electron microscopy and immunoperoxidase studies of early multiple sclerosis lesions. *Neurology* 1976; **26**: 29-32.
7. Prineas JW, Wright RG. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab Invest* 1978; **38**: 409-21.
8. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007; **17**: 210-8.
9. Woodroffe MN, Bellamy AS, Feldmann M, Davison AN, Cuzner ML. Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J.Neurol.Sci.* 1986; **74**: 135-52.
10. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu.Rev.Immunol.* 2005; **23**: 683-747.
11. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N.Engl.J.Med.* 1998; **339**: 285-91.
12. Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; **3**: 483-92.
13. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP *et al.* Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum.Mol.Genet.* 2006; **15**: 2813-24.
14. Martyn CN, Cruddas M, Compston DA. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1993; **56**: 167-8.

15. Hirst CL, Swingler R, Compston A, Ben Shlomo Y, Robertson NP. Survival and Cause of death in multiple sclerosis: A prospective population based study. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 2008.
16. Kurtzke JF, Beebe GW, Nagler B, Auth TL, Kurland LT, Nefzger MD. Prognosis in multiple sclerosis. *Trans.Am.Neurol.Assoc.* 1973; **98**: 272-4.
17. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog.Neurobiol.* 1995; **47**: 425-48.
18. Williamson DM, Henry JP, Schiffer R, Wagner L. Prevalence of multiple sclerosis in 19 Texas counties, 1998-2000. *J.Environ.Health* 2007; **69**: 41-5.
19. Sadovnick AD, Ebers GC, Wilson RW, Paty DW. Life expectancy in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology* 1992; **42**: 991-4.
20. Frohman EM, Filippi M, Stuve O *et al.* Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions. *Arch.Neurol.* 2005; **62**: 1345-56.
21. Miller JR. The importance of early diagnosis of multiple sclerosis. *J.Manag.Care Pharm.* 2004; **10**: S4-11.
22. Williams KC, Ulvestad E, Hickey WF. Immunology of multiple sclerosis. *Clin.Neurosci.* 1994; **2**: 229-45.
23. McFarland HF. Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* 1999; **20**: 1777-8.
24. Tajouri L, Fernandez F, Griffiths LR. Gene expression studies in multiple sclerosis. *Curr.Genomics* 2007; **8**: 181-9.
25. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain* 2003; **126**: 770-82.
26. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 2000; **343**: 1430-8.
27. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C *et al.* Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; **128**: 2705-12.
28. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 2000; **343**: 938-52.
29. Thompson AJ, Hobart JC. Multiple sclerosis: assessment of disability and disability scales. *J.Neurol.* 1998; **245**: 189-96.
30. Bowen J, Gibbons L, Ganas A, Kraft GH. Self-administered Expanded Disability Status Scale with functional system scores correlates well with a physician-administered test. *Mult.Scler.* 2001; **7**: 201-6.

31. Lassmann H. Models of multiple sclerosis: new insights into pathophysiology and repair. *Curr.Opin.Neurol.* 2008; **21**: 242-7.
32. Lassmann H. Recent neuropathological findings in MS--implications for diagnosis and therapy. *J.Neurol.* 2004; **251 Suppl 4**: IV2-IV5.
33. Prineas JW, Graham JS. Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Ann.Neurol.* 1981; **10**: 149-58.
34. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 1998; **338**: 278-85.
35. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J *et al.* Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2006; **65**: 855-65.
36. Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann.Neurol.* 1993; **33**: 137-51.
37. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N.Engl.J.Med.* 2006; **354**: 942-55.
38. Bo L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mork SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 2003; **62**: 723-32.
39. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann.Neurol.* 2000; **47**: 707-17.
40. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann.Neurol.* 2004; **55**: 458-68.
41. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1999; **53**: 457-65.
42. Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J.Neuroimmune.Pharmacol.* 2007; **2**: 140-53.
43. Aktas O, Prozorovski T, Zipp F. Death ligands and autoimmune demyelination. *Neuroscientist.* 2006; **12**: 305-16.
44. Ruddle NH, Bergman CM, McGrath KM *et al.* An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J.Exp.Med.* 1990; **172**: 1193-200.
45. Selmaj K, Raine CS, Cross AH. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann.Neurol.* 1991; **30**: 694-700.
46. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J.Clin.Invest* 1991; **87**: 949-54.

47. Hofman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J.Exp.Med.* 1989; **170**: 607-12.
48. Hauser SL, Doolittle TH, Lincoln R, Brown RH, Dinarello CA. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* 1990; **40**: 1735-9.
49. Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J.Immunol.* 1990; **144**: 129-35.
50. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 1991; **325**: 467-72.
51. Maimone D, Gregory S, Arnason BG, Reder AT. Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 1991; **32**: 67-74.
52. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B *et al.* Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann.Neurol.* 1995; **37**: 82-8.
53. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B *et al.* Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1994; **44**: 1523-6.
54. Martino G, Consiglio A, Franciotta DM *et al.* Tumor necrosis factor alpha and its receptors in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J.Neurol.Sci.* 1997; **152**: 51-61.
55. Matsuda M, Tsukada N, Miyagi K, Yanagisawa N. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptor in patients with multiple sclerosis and HTLV-1-associated myelopathy. *J.Neuroimmunol.* 1994; **52**: 33-40.
56. Geppert A, Losy J. [TNF-alpha and soluble TNF receptor p55 in patients with multiple sclerosis]. *Neurol.Neurochir.Pol.* 1999; **33**: 807-14.
57. Jurewicz AM, Walczak AK, Selmaj KW. Shedding of TNF receptors in multiple sclerosis patients. *Neurology* 1999; **53**: 1409-14.
58. Bilinska M, Frydecka I, Podemski R, Gruszka E. Serum levels of sTNFR-1 and sFas in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Med.Sci.Monit.* 2002; **8**: CR720-CR723.
59. Spuler S, Yousry T, Scheller A *et al.* Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *J.Neuroimmunol.* 1996; **66**: 57-64.
60. Gimenez MA, Sim J, Archambault AS, Klein RS, Russell JH. A tumor necrosis factor receptor 1-dependent conversation between central nervous system-specific T cells and the central nervous system is required for inflammatory infiltration of the spinal cord. *Am.J.Pathol.* 2006; **168**: 1200-9.
61. Villarroya H, Marie Y, Ouallet JC, Le Saux F, Tchelingierian JL, Baumann N. Expression of TNF alpha in central neurons of Lewis rat spinal cord after EAE induction. *J.Neurosci.Res.* 1997; **49**: 592-9.



62. Eugster HP, Frei K, Bachmann R, Bluethmann H, Lassmann H, Fontana A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. *Eur.J.Immunol.* 1999; **29**: 626-32.
63. Kuroda Y, Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor-alpha augments experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J.Neuroimmunol.* 1991; **34**: 159-64.
64. Baker D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, Feldmann M. Control of established experimental allergic encephalomyelitis by inhibition of tumor necrosis factor (TNF) activity within the central nervous system using monoclonal antibodies and TNF receptor-immunoglobulin fusion proteins. *Eur.J.Immunol.* 1994; **24**: 2040-8.
65. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; **296**: 1634-5.
66. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; **104**: 487-501.
67. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; **115**: 1-20.
68. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; **3**: 745-56.
69. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P *et al.* An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998; **282**: 1281-4.
70. Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J.Biol.Chem.* 1993; **268**: 26350-7.
71. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; **76**: 959-62.
72. Wajant H. Death receptors. *Essays Biochem.* 2003; **39**: 53-71.
73. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* 2003; **10**: 45-65.
74. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; **74**: 845-53.
75. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y *et al.* TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst.Schering.Res.Found.Workshop* 2006; 161-86.
76. Moldawer, L. L. *Fundamental Immunology-fifth edition.* TNF-a signaling through two receptorts. 2003. Lipincott Williams&Wilkins.  
Ref Type: Generic
77. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; **84**: 299-308.

78. Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; **89**: 4845-9.
79. Waetzig GH, Rosenstiel P, Arlt A *et al.* Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. *FASEB J.* 2005; **19**: 91-3.
80. Tartaglia LA, Goeddel DV. Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *J.Biol.Chem.* 1992; **267**: 4304-7.
81. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 2002; **14**: 477-92.
82. Lin Y, Choksi S, Shen HM *et al.* Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J.Biol.Chem.* 2004; **279**: 10822-8.
83. Nakayama M, Manabe N, Inoue N, Matsui T, Miyamoto H. Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) alpha, TNFalpha receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. *Biol.Reprod.* 2003; **68**: 530-5.
84. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680-3.
85. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995; **269**: 1424-7.
86. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 1996; **87**: 565-76.
87. Reinhard C, Shamon B, Shyamala V, Williams LT. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J.* 1997; **16**: 1080-92.
88. Mukhopadhyay A, Suttles J, Stout RD, Aggarwal BB. Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 abrogates ligand-mediated activation of nuclear factor-kappa B and of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J.Biol.Chem.* 2001; **276**: 31906-12.
89. Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M *et al.* Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk.Res.* 2003; **27**: 583-91.
90. Duckett CS, Thompson CB. CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev.* 1997; **11**: 2810-21.

91. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D *et al.* Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J.Cell Sci.* 2002; **115**: 2757-70.
92. Ameloot P, Declercq W, Fiers W, Vandenabeele P, Brouckaert P. Heterotrimers formed by tumor necrosis factors of different species or muteins. *J.Biol.Chem.* 2001; **276**: 27098-103.
93. Takada Y, Aggarwal BB. Evidence that genetic deletion of the TNF receptor p60 or p80 in macrophages modulates RANKL-induced signaling. *Blood* 2004; **104**: 4113-21.
94. Takada Y, Aggarwal BB. Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 sensitizes macrophages to lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappa B, mitogen-activated protein kinases, and apoptosis. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**: 23390-7.
95. Kuhne BS, Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* 2002; **33**: 1078, 1080-2, 1084.
96. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001; **25**: 386-401.
97. Dai Z, Lakkis FG. The role of cytokines, CTLA-4 and costimulation in transplant tolerance and rejection. *Curr.Opin.Immunol.* 1999; **11**: 504-8.
98. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 2000; **25**: 169-93.
99. Wang T, Brown MJ. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal.Biochem.* 1999; **269**: 198-201.
100. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 1993; **11**: 1026-30.
101. Antel J. Multiple sclerosis--emerging concepts of disease pathogenesis. *J.Neuroimmunol.* 1999; **98**: 45-8.
102. Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr.Mol.Med.* 2002; **2**: 257-72.
103. Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res.* 2000; **301**: 163-71.
104. Julia E, Montalban X, Al Zayat H *et al.* Deficient Fas expression by CD4+ CCR5+ T cells in multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2006; **180**: 147-58.
105. Gomes AC, Jonsson G, Mjornheim S, Olsson T, Hillert J, Grandien A. Upregulation of the apoptosis regulators cFLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 2003; **135**: 126-34.

106. Bachmann R, Eugster HP, Frei K, Fontana A, Lassmann H. Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am.J.Pathol.* 1999; **154**: 1417-22.
107. Lassmann H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult.Scler.* 1998; **4**: 93-8.
108. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 1996; **6**: 259-74.
109. Thompson AJ, Polman CH, Miller DH *et al.* Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997; **120 ( Pt 6)**: 1085-96.
110. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T *et al.* Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; **64**: 1144-51.
111. Confavreux C, Vukusic S. [The natural history of multiple sclerosis]. *Rev.Prat.* 2006; **56**: 1313-20.
112. Cannella B, Gaupp S, Omari KM, Raine CS. Multiple sclerosis: death receptor expression and oligodendrocyte apoptosis in established lesions. *J.Neuroimmunol.* 2007; **188**: 128-37.
113. Tsao DH, Hum WT, Hsu S, Malakian K, Lin LL. The NMR structure of the TRADD death domain, a key protein in the TNF signaling pathway. *J.Biomol.NMR* 2007; **39**: 337-42.
114. Swarup V, Das S, Ghosh S, Basu A. Tumor necrosis factor receptor-1-induced neuronal death by TRADD contributes to the pathogenesis of Japanese encephalitis. *J.Neurochem.* 2007; **103**: 771-83.
115. Walsh CM, Wen BG, Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Dixit VM, Hedrick SM. A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity.* 1998; **8**: 439-49.
116. Park SM, Schickel R, Peter ME. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2005; **17**: 610-6.
117. Chen Y, Ma D, Huang QL *et al.* Expression, purification and characterization of C-FADD. *Cell Mol.Immunol.* 2009; **6**: 295-301.
118. Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* 2003; **278**: 25534-41.
119. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; **81**: 505-12.

120. Yin A, Jiang Y, Zhang X, Luo H. Overexpression of FADD enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells. *Med.Oncol.* 2010; **27**: 397-405.
121. Ho CC, Rideout HJ, Ribe E, Troy CM, Dauer WT. The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J.Neurosci.* 2009; **29**: 1011-6.
122. Werner MH, Wu C, Walsh CM. Emerging roles for the death adaptor FADD in death receptor avidity and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2332-8.
123. Imtiyaz HZ, Zhou X, Zhang H, Chen D, Hu T, Zhang J. The death domain of FADD is essential for embryogenesis, lymphocyte development, and proliferation. *J.Biol.Chem.* 2009; **284**: 9917-26.
124. Takikita M, Hu N, Shou JZ *et al.* Biomarkers of apoptosis and survival in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC.Cancer* 2009; **9**: 310.
125. Rudick RA, Goodman A, Herndon RM, Panitch HS. Selecting relapsing remitting multiple sclerosis patients for treatment: the case for early treatment. *J.Neuroimmunol.* 1999; **98**: 22-8.
126. Yang X, Zhu LJ, Ji YL. [Expression of TNF-alpha signaling adapter proteins in peripheral blood mononuclear cells in lupus nephritis patients of different TCM asthenia syndromes]. *Zhongguo Zhong.Xi.Yi.Jie.He.Za Zhi.* 2009; **29**: 34-9.
127. Xu H, He L, Feng X, Kapoor A, Tang D. Specific reduction of fas-associated protein with death domain (FADD) in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 2009; **27**: 836-43.
128. Reuss R, Pohle S, Retzlaff K, Hemberger J, Oschmann P. Interferon beta-1a induces tumor necrosis factor receptor 1 but decreases tumor necrosis factor receptor 2 leukocyte mRNA levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation.* 2009; **16**: 171-6.

## 8 Anhang

### 8.1 Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

AMS	Akute Multiple Sklerose
AK	Antikörper
ASK	apoptosis-stimulated kinase
CD4+	cluster of differation 4 Rezeptor positiv
CD8+	cluster of differation 8 Rezeptor positiv
CD95	cluster of differation 95 Zelle
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
CRD	cystein rich domain
DD	death domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDSS	expanded disability status scale
FADD	fas-associated death domain protein
FRET	fluorescence resonance energy tranfer
ICD	intrazelluläre Domäne
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IKK	inhibitor of $\kappa$ B protein
IL-23	Interleukin -23
JKN	JUN N-terminal kinase
LFA-1	leukozytenfunktionsassoziiertes Antigen-1
LT	Lymphotoxin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEKK	extracellular signal regulated kinase kinase
mRNA	massanger ribonukleic acid
MS	Multiple Sklerose
NF $\kappa$ BR	receptor activator of neklear $\kappa$ B
PBGD	Porphobilinogendesaminase
pFADD	phosphorylierte Form des FADD

PP-MS	primär progrediente MS
RANKL	receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand
RNA	ribonucleic acid
RR-MS	remitting relapsing (schubförmige) MS
RIP	receptor interacting protein
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SP-MS	sekundär progrediente MS
sTNF-R	soluble (löslicher) Tumornekrose Faktor Rezeptor
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TNF $\alpha$	Tumornekrose Faktor $\alpha$
TNF-R1	Tumornekrose Faktor Rezeptor 1
TNF-R2	Tumornekrose Faktor Rezeptor 2
TNFR-Superfamilie	Tumornekrose Faktor Rezeptor-Superfamilie
TRADD	TNF receptor-associated death domain protein
TRAF2	TNF-R-associated factor 2
VLA-4	very large antigen-4
ZNS	Zentrales Nervensystem

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



### 7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die in den letzten Jahren durch ihre Mitarbeit und Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Patrick Oschmann möchte ich mich herzlich für das Anvertrauen dieses spannenden Projektes und die damit auch verbundenen interessanten Einblicke in die neurologische Klinik bedanken.

Kein geringerer Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. med. Reinhard Reuss. Ohne seine tatkräftige Unterstützung in allen Bereichen dieser Arbeit, seine ständige Präsenz und Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht wünschen können.

Meinem lieben Co-Doktoranden und Laborpartner Herrn Andreas Mirau danke ich für seine stets unermüdliche Hilfe in Wort und Tat an all den langen Laborabenden.

Herrn Dr. Bödecker und Frau Christine Scheibelhut aus dem Institut für klinische Informatik möchte ich herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit und ihre stetige Diskussionsbereitschaft danken.

Dem Labor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie und all den lieben Mitarbeitern des Giessener Liquorlabors die mir die Laborarbeit mit ihrer zuvorkommenden Art stets leicht gemacht haben gilt ein ganz besonderer Dank für ihre tatkräftige Unterstützung.

Meiner lieben Mutter Gabriela danke ich für ihren Rückhalt und ihre Motivation in allen Lebenslagen, ohne sie wäre all dies nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich aus ganzem Herzen bei meinem lieben Alec bedanken. Durch seine Unterstützung, seine hilfreichen Ratschläge und seinen Glauben an mich hat er mir die Kraft gegeben diese Arbeit abzuschließen.